

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日  
2003 年 6 月 12 日 (12.06.2003)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 03/048357 A1

- (51) 国際特許分類<sup>7</sup>: C12N 15/09,  
C12P 21/00, 21/08, C07K 1/00
- (21) 国際出願番号: PCT/JP02/12701
- (22) 国際出願日: 2002 年 12 月 4 日 (04.12.2002)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:  
特願2001-370541 2001 年 12 月 4 日 (04.12.2001) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 三菱  
ウェルファーマ株式会社 (MITSUBISHI PHARMA  
CORPORATION) [JP/JP]; 〒541-0046 大阪府 大阪市  
中央区平野町二丁目 6 番 9 号 Osaka (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 高野 貴晴  
(KOUNO, Takaharu) [JP/JP]; 〒103-8405 東京都 中央

区 日本橋本町二丁目 2 番 6 号 三菱ウェルファーマ株式会社 東京本社内 Tokyo (JP). 勝村 泰彦 (KAT-SUMURA, Yasuhiko) [JP/JP]; 〒103-8405 東京都 中央区 日本橋本町二丁目 2 番 6 号 三菱ウェルファーマ株式会社 東京本社内 Tokyo (JP).

(74) 代理人: 高柳 昌生 (TAKAYANAGI, Masau); 〒103-8405 東京都 中央区 日本橋本町二丁目 2 番 6 号 三菱ウェルファーマ株式会社 知的財産部 Tokyo (JP).

(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM,

/続葉有]

(54) Title: METHOD OF ACTIVATING PROTEIN

(54) 発明の名称: 蛋白質の活性化方法

(57) Abstract: A method of producing a protein having free cysteine with the use of a serum-free medium, characterized in that the protein is produced in the activated state; a method of producing a protein by culturing in a serum-free medium in accordance with the above method; a method of activating a protein having free cysteine which has been produced in the inactivated state; and a protein obtained by any of the above methods. This protein shows physicochemical or biological properties comparable to a protein obtained by using a serum medium.

(57) 要約:

本発明は、遊離のシステインを有する蛋白質を無血清培地を用いて生産する方法であって、該蛋白質が活性化されて生産されることを特徴とする方法である。また、該方法を用いて、蛋白質を無血清培地を用いた培養によって生産する方法である。その他、不活性型として生産された遊離のシステインを有する蛋白質を活性化する方法である。さらに、上記いずれかの方法によって得られる蛋白質も、本発明に含まれ、該蛋白質は、血清培地で得られる蛋白質と同等の理化学的性質又は生物学的性質を示す。

WO 03/048357 A1



AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許  
(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB,  
GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SI, SK, TR), OAPI 特  
許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR,  
NE, SN, TD, TG).

2文字コード及び他の略語については、定期発行される  
各PC7ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語  
のガイダンスノート」を参照。

添付公開書類:

— 国際調査報告書

明細書  
蛋白質の活性化方法

技術分野

- 5       本発明は、遊離のシステインを有する蛋白質を無血清培地を用いて生産する方法及びそれにより得られる蛋白質に関するものである。

背景技術

- 10       従来、遺伝子組換技術において動物細胞を宿主とし、蛋白質を生産するためには血清が必要である。血清は高価でかつロット間差が存在し、使用に際しては厳格なロット管理を行わなくてはならない。また、生体物質由来であるため、未知のウイルス等といった病原性伝播物質の混入が否定できないが、これら未知の病原性伝播物質の不活性化、除去は困難である。このため、医薬品用途に用いる蛋白質を生産する際には、血清を使用しない無血清培養を用いることが望ましい。

- 15       しかしながら、動物細胞培養の際に血清を使用しないと、細胞の機能維持に必要とされる成分の補給が十分に行えず、十分な有用蛋白質を確保できない場合が多い。また、生産される蛋白質が目的蛋白質と物理的、生化学的、生物学的に微妙に変化していることも想定され、血清を使用せずに培養を行い有用蛋白質の生産を行う際には、十分な注意が必要である。

- 20       ところで、一般に分子表面に出ている蛋白質の遊離のシステインのチオール基は、分子内で架橋を形成しているシステインのジスルフィド結合に比べて不安定で、弱い還元条件によって交換反応が起こるものと考えられる。

該チオール基が何らかの望ましくない修飾等を受けている

場合、その交換反応を試みる際に、ジチオスレイトールや２  
メルカプトエタノールのような強い還元剤を用いると、分  
子自体の立体構造がもとに戻らなくなる。このため、強い還  
元剤を用いる場合には、再現性良く特定の部分のみの反応を  
5 進めることは非常に困難である。

そこで、弱い還元剤のみの存在によって反応を行わせるこ  
とが考えられるが、新たに分子間のジスルフィド結合が架橋  
を形成し重合体の形成が促進される怖れがある。

一方、高分子量の蛋白質に弱い還元処理を施す場合、塩基  
10 性の緩衝液中で行うだけでは分子の立体構造による障害によ  
り、目的のチオール基部分が試薬に十分さらされないことで、  
反応が不十分にしか進行しないことが考えられる。

そのため、従来の技術では、高濃度のグアニジン塩酸や尿  
素などの変性剤を系内に添加することで分子の変性を行い、  
15 通常の緩衝液中では分子表面に出にくい構造を試薬にさらす  
方法が行われている。

しかしながら、これらの強い変性剤は高分子の蛋白質に対  
して非特異的かつ不可逆的な副反応を起こし、分子構造の変  
化による分解物生成が引き起こされることになる。

20 これらの重合体、分解物などの副反応生成物の生成は、目  
的蛋白質を高純度で大量に得ようとする際に再現性、収率の  
点で問題となり、活性化された蛋白質を薬剤として利用しよ  
うとする場合には大きな障害となる。

## 25 発明の開示

本発明の課題は、血清培地において生産される蛋白質と同  
等の効果を有する蛋白質を、無血清培地で生産することにあ  
る。

そこで本発明者らは、反応条件の検討を重ね、反応生成物

の解析を詳細に行い、かかる問題点を解決することにより、本発明を完成するに至った。

すなわち本発明の要旨は以下の通りである。

5 (1) 遊離のシステインを有する蛋白質を無血清培地を用いて生産する方法であって、遊離のシステインを有する蛋白質が活性化されて生産されることを特徴とする方法。

(2) 蛋白質生産時の蛋白質分子内のジスルフィド結合を還元せず、かつ、遊離のシステインの修飾を還元するのに十分な還元剤の存在下に行われることを特徴とする前記の方法。

10 (3) 還元剤が、システインであることを特徴とする前記の方法。

(4) 抗酸化剤の存在下に行われることを特徴とする前記の方法。

15 (5) 抗酸化剤が、蛋白質間の遊離のシステインを介した重合化を抑制するのに十分な抗酸化剤であることを特徴とする前記の方法。

(6) 抗酸化剤が、アスコルビン酸であることを特徴とする前記の方法。

20 (7) 遊離のシステインの修飾を還元しやすくする物質の存在下に行われることを特徴とする前記の方法。

(8) 遊離のシステインの修飾を還元しやすくする物質が、塩化ナトリウム又は塩化カリウムであることを特徴とする前記の方法。

25 (9) 蛋白質が、ジスルフィド結合を形成していない遊離のシステインを分子内に有し、かつシステインのチオール基が結合活性に関与している蛋白質であることを特徴とする前記の方法。

(10) 蛋白質が、組換え体蛋白質であることを特徴とする前記の方法。

- (11) 蛋白質が、抗体である前記のいずれかに記載の方法。
- (12) 抗体が、抗体の可変領域に遊離のシステインを有する抗体であることを特徴とする前記の方法。
- (13) 抗体が、ヒトモノクローナル抗体であることを特徴とする前記の方法。
- 5 (14) ヒトモノクローナル抗体が、重鎖の超可変領域に、配列表の配列番号1、2及び3のアミノ酸配列を含み、軽鎖の超可変領域に、配列表の配列番号4、5及び6のアミノ酸配列を含む抗体であることを特徴とする前記の方法。
- 10 (15) ヒトモノクローナル抗体が、配列表の配列番号7のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域と、配列表の配列番号8のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域とを含む抗体であることを特徴とする前記の方法。
- (16) 抗体が、 $F(ab')_2$  化抗体であることを特徴とする前記の方法。
- 15 (17) 前記の方法を用いて、蛋白質を無血清培地を用いた培養によって生産する方法。
- (18) 蛋白質が、ジスルフィド結合を形成していない遊離のシステインを分子内に有し、かつシステインのチオール基が結合活性に関与している蛋白質であることを特徴とする前記の方法。
- 20 (19) 蛋白質が、組換え体蛋白質であることを特徴とする前記の方法。
- (20) 蛋白質が、抗体であることを特徴とする前記の方法。
- 25 (21) 抗体の可変領域に遊離のシステインを有することを特徴とする前記の方法。
- (22) 抗体が、ヒトモノクローナル抗体であることを特徴とする前記の方法。
- (23) 抗体が、重鎖の超可変領域に、配列表の配列番号1、

2 及び 3 のアミノ酸配列を含み、軽鎖の超可変領域に、配列表の配列番号 4、5 及び 6 のアミノ酸配列を含む抗体であることを特徴とする前記の方法。

- 5 (24) 抗体が、配列表の配列番号 7 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域と、配列表の配列番号 8 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域とを含む抗体であることを特徴とする前記の方法。

(25) 抗体が、 $F(ab')_2$  化抗体であることを特徴とする前記の方法。

- 10 (26) 不活性型として生産された遊離のシステインを有する蛋白質を活性化する方法であって、還元剤、抗酸化剤及び遊離のシステインの修飾を還元しやすくする物質の存在下に行われることを特徴とする方法。

- 15 (27) 生産された蛋白質の蛋白質分子内のジスルフィド結合を還元せず、かつ、遊離のシステインの修飾を還元するのに十分な還元剤の存在下に行われることを特徴とする前記の方法。

(28) 還元剤が、システインであることを特徴とする前記の方法。

- 20 (29) 抗酸化剤が、蛋白質間の遊離のシステインを介した重合化を抑制するのに十分な抗酸化剤であることを特徴とする前記の方法。

(30) 抗酸化剤が、アスコルビン酸であることを特徴とする前記の方法。

- 25 (31) 遊離のシステインの修飾を還元しやすくする物質が、塩化ナトリウム又は塩化カリウムであることを特徴とする前記の方法。

(32) 蛋白質が、ジスルフィド結合を形成していない遊離のシステインを分子内に有し、かつシステインのチオール基

が結合活性に関与している蛋白質であることを特徴とする前記の方法。

(33) 蛋白質が、組換え体蛋白質であることを特徴とする前記の方法。

5 (34) 蛋白質が、抗体である前記の方法。

(35) 抗体が、抗体の可変領域に遊離のシステインを有する抗体であることを特徴とする前記の方法。

(36) 抗体が、ヒトモノクローナル抗体であることを特徴とする前記の方法。

10 (37) ヒトモノクローナル抗体が、重鎖の超可変領域に、配列表の配列番号1、2及び3のアミノ酸配列を含み、軽鎖の超可変領域に、配列表の配列番号4、5及び6のアミノ酸配列を含む抗体であることを特徴とする前記の方法。

15 (38) ヒトモノクローナル抗体が、配列表の配列番号7のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域と、配列表の配列番号8のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域とを含む抗体であることを特徴とする前記の方法。

(39) 抗体がF(ab')<sub>2</sub>化抗体であることを特徴とする前記の方法。

20 (40) 還元剤、抗酸化剤及び遊離のシステインの修飾の還元をしやすい物質の添加を、抗体精製後のホール抗体存在時に行うことを特徴とする前記の方法。

(41) 前記の方法により得られた蛋白質。

25 (42) 蛋白質が、血清培地で得られる蛋白質と同等の理化学的性質又は生物学的性質を示すことを特徴とする前記の蛋白質。

(43) 前記の蛋白質を含む医薬組成物。

(44) 抗腫瘍剤であることを特徴とする前記の医薬組成物。



## 図面の簡単な説明

第1図は、GAH抗体の製造手順のフローチャートを示す図である。

5 第2図は、CD CHO 培地を用いて培養したGAHホール抗体にシステインを添加した後のイオン交換HPLCクロマトグラム結果を表す図である。

第3図は、CD CHO 培地を用いて培養したGAHホール抗体にシステイン及びアスコルビン酸を添加した後のイオン交換HPLCクロマトグラム結果を表す図である。

10 第4図は、ExCell1325-PF 培地を用いて培養したGAHホール抗体にグアニジン塩酸を添加した後のイオン交換HPLCクロマトグラム結果を表す図である。

第5図は、ExCell1325-PF 培地を用いて培養したGAHホール抗体に塩化ナトリウムを添加した後のイオン交換HPLCクロマトグラム結果を表す図である。

第6図は、ExCell1325-PF 培地を用いて培養したGAHホール抗体にアスコルビン酸及び塩化ナトリウムを添加した後のイオン交換HPLCクロマトグラム結果を表す図である。

20 第7図血清入り培養GAHホール抗体のイオン交換HPLCクロマトグラム結果を表す図である。

第8図は、CD CHO 培地を用いて培養したGAHホール抗体のイオン交換HPLCクロマトグラム結果を表す図である。

25 第9図は、CD CHO 培地を用いて培養したGAHホール抗体に本発明の処理を施した後のイオン交換HPLCクロマトグラム結果を表す図である。

第10図は、ExCell1325-PF 培地を用いて培養したGAHホール抗体のイオン交換HPLCクロマトグラム結果を表す図である。

第11図は、ExCell1325-PF 培地を用いて培養したGAH

ホール抗体に本発明の処理を施した後のイオン交換HPLCクロマトグラム結果を表す図である。

第12図は、血清入り培養F(ab')<sub>2</sub>化GAH抗体のイオン交換HPLCクロマトグラム結果を表す図である。

5 第13図は、CD CHO 培地を用いて培養したF(ab')<sub>2</sub>化GAH抗体のイオン交換HPLCクロマトグラム結果を表す図である。

第14図は、CD CHO 培地を用いて培養したF(ab')<sub>2</sub>化GAH抗体に本発明の処理を施した後のイオン交換HPLCクロマトグラム結果を表す図である。

第15図は、ExCell325-PF 培地を用いて培養したF(ab')<sub>2</sub>化GAH抗体のイオン交換HPLCクロマトグラム結果を表す図である。

15 第16図は、ExCell325-PF 培地を用いて培養したF(ab')<sub>2</sub>化GAH抗体に本発明の処理を施した後のイオン交換HPLCクロマトグラム結果を表す図である。

第17図は、ExCell-325 PF 培地を用いて培養したGAHホール抗体のイオン交換HPLCクロマトグラム結果を表す図面である。

20 第18図は、ExCell-325 PF 培地にシステイン(1mM)を加えて培養したGAHホール抗体のイオン交換HPLCクロマトグラム結果を表す図面である。

第19図は、ExCell-325 PF 培地にシステイン(5mM)を加えて培養したGAHホール抗体のイオン交換HPLCクロマトグラム結果を表す図面である。

25 第20図は、ExCell-325 PF 培地にシステイン(10mM)を加えて培養したGAHホール抗体のイオン交換HPLCクロマトグラム結果を表す図面である。

発明を実施するための最良の形態

以下、本発明をさらに詳細に説明する。

本発明は、遊離のシステインを有する蛋白質を無血清培地で生産する方法であって、遊離のシステインを有する蛋白質が活性化されて生産されることを特徴とするものである。

このような方法の一例としては、遊離のシステインを有する蛋白質が活性化されるために、①還元剤、②抗酸化剤又は③遊離のシステインの修飾を還元しやすくする物質の存在下に行われる方法が挙げられる。

このような方法においては、上記の①、②又は③の添加を各々単独で施しても良く、上記の2つの組み合わせ（①及び②、①及び③、又は②及び③）の添加を施すことがより好ましく、①、②及び③の全ての添加を施すのが最適である。

また、上記の①、②又は③は、蛋白質生産時のいずれの段階で存在しても良いが、本発明においては上記の①、②又は③を、無血清培地での培養の際に添加したり、結合活性が不活性型の蛋白質を活性型蛋白質に変換する際に添加するのが好ましく、結合活性が不活性型の蛋白質を活性型蛋白質に変換する際に添加するのがより好ましい。例えば、後述の実施例で示したGAH抗体で行う場合には、第1図に示す通り、無血清培地での培養、生産後、未精製バルクから精製したホール抗体の存在下の時点で添加することが挙げられる。

以下、①還元剤、②抗酸化剤、③遊離のシステインの修飾を還元しやすくする物質について詳述する。

本発明における還元剤としては、例えば蛋白質が抗体の場合には、強い還元剤を用いると抗体分子内の一部もしくは全てのジスルフィド結合が還元されてしまうので、比較的弱い還元剤が適している。すなわち本発明の還元剤は、蛋白質分子内のジスルフィド結合を還元せず、かつ、遊離のシステイ

5      ンの修飾を還元するのに十分な還元剤であることがその条件を満たすものである。尚、本発明においては、例えば後述の実施例に記載の方法により本発明に適する還元の程度の判定が可能である。本発明の還元剤は特定の還元剤に限定されるものではないが、例えばシステインが最適である。好ましい一例として、活性型蛋白質への変換時に 0.1 ~ 10 mM、好ましくは 0.5 ~ 5 mM、より好ましくは 1 ~ 3 mM の L-システインを添加することが挙げられる。

10      また本発明における抗酸化剤としては、蛋白質間の遊離のシステインを介した重合化を防止することができる抗酸化剤が挙げられる。本発明で用いられる抗酸化剤は、蛋白質間の遊離のシステインを介した重合化を抑制するのに十分な抗酸化剤であることが好ましく、例えば後述の実施例に記載の方法により本発明に適する抗酸化剤の量を決定することが可能である。本発明の抗酸化剤は特定の抗酸化剤に限定されるものではないが、例えばアスコルビン酸が最適である。好ましい一例として、活性型蛋白質への変換時に 1 ~ 50 mM、好ましくは 5 ~ 30 mM、より好ましくは 10 ~ 20 mM のアスコルビン酸を添加することが挙げられる。

20      一般的に還元剤とは、電子（水素原子）を与える作用のあるものを指すことから、抗酸化剤も、ジスルフィド結合を還元するという意味においては還元作用を有している（還元剤）ともとらえられる。しかしながら、上述の通り、本発明の還元剤とは、蛋白質分子内のジスルフィド結合を還元せず、かつ、遊離のシステインの修飾を還元するのに十分であるものがその条件を満たすものである。また本発明の抗酸化剤とは、蛋白質間の遊離のシステインを介した重合化を抑制するのに十分であることがその条件を満たすものである。

25      また本発明は、遊離のシステインの修飾を還元しやすくす

る物質の存在下に行われる。本発明で用いられる遊離のシステインの修飾を還元しやすくする物質は、蛋白質が分子構造の変化による分解物生成をおこさない程度に蛋白質分子の柔軟性を増強させ蛋白質分子をときほぐし、蛋白質の遊離のシステイン（チオール基部分）を分子表面にさらけ出すことができる物が好ましい。

遊離のシステインの修飾を還元しやすくする物質としては特定の物質に限定されるものではないが、例えば塩化ナトリウム又は塩化カリウムなどの1酸塩基塩が好ましい。具体的には、約 0.1～4 M、好ましくは約 0.25～3 M、より好ましくは約 0.8～2 Mの比較的高濃度の塩化ナトリウム等を存在させることが好ましい。このような条件にすることで、副反応はほとんど起こらない。さらに、蛋白質分子の柔軟性が増強され、還元される遊離のシステインは反応にさらされる確率が高くなり、蛋白質の活性型への変換が効率良く行われることになる。その結果、再現性良く反応を進めることができ、分解物の生成が極めて低く抑えられることから、有用蛋白質の調製には特に有用な方法である。

さらに本発明は、培養に先立って無血清培養液中に上述の①、②又は③の試薬を加えることも可能である。例えば①の還元剤の場合には、培養液中に終濃度 0.1～200mM、好ましくは 5～100 mM、より好ましくは 10～50 mMになる様に L-システインをさらに加えて培養することにより、同様な効果を得ることもできる。このような方法により、遊離のシステインへの培地中成分による修飾を防ぎ、活性型の蛋白質を直接培地中に生産させ、これを精製後に直ちに用いることも問題点を解決するための有用な手段のひとつである。

また本発明においては、不活性型として生産された遊離のシステインを有する蛋白質を活性化する方法であって、不活

性型として生産された蛋白質が生産された後に上述の①、②又は③の試薬による処理を行うことを特徴とする方法もその要旨として挙げられる。

5       ここで用いられる還元剤、抗酸化剤及び遊離のシステインの修飾を還元しやすくする物質としては、前述の定義の通りである。

10       本発明の生産方法及び活性化方法において用いられる培地としては、培地成分中に牛（胎児）血清などの血清を含まない無血清培地が挙げられる。一例として、本実施例に記載のような無血清培地 CD CHO（インビトロジェン社）及び ExCell325-PF（J R H 社）などが挙げられる。尚、本発明の活性化方法においては、不活性型として蛋白質が生産される培地であれば、上記の無血清培地に限定されることなく、血清培地でも良い。血清培地の血清濃度としては、不活性型の蛋白質が生産される濃度であれば特に限定されないが、例えば約 5 % 以下が挙げられる。

20       本発明の対象となる蛋白質は、その分子構造内に遊離のシステインを有しているのが特徴である。また、ジスルフィド結合を形成していない遊離のシステインを分子内に有し、かつシステインのチオール基が結合活性に関与している蛋白質である。遊離（状態）とは、一般に不対電子をもち、比較的不安定で、反応性に富んだ状態を指し、システインの場合にはそのチオール基部分が反応性に富む。遊離のシステイン、特にそのチオール基部分は蛋白質の結合活性に関与している場合があり、特に蛋白質が抗体の場合は、可変領域に存在する遊離のシステイン、特にそのチオール基部分は抗原との結合活性に関与していると考えられる。具体的には、抗体であることが好ましく、抗体の可変領域に遊離のシステインを有する抗体が好ましい。より好ましくはモノクローナル抗体で

あり、最も好ましくはヒトモノクローナル抗体である。ヒトモノクローナル抗体は、医薬としてヒトに投与する場合、異種動物の蛋白質ではない点で有利である。

5 本発明で対象となるヒトモノクローナル抗体の一例としては、重鎖の超可変領域に、配列表の配列番号 1、2 及び 3 のアミノ酸配列を含み、軽鎖の超可変領域に、配列表の配列番号 4、5 及び 6 のアミノ酸配列を含む抗体が挙げられる。これらのアミノ酸配列は、通常、重鎖及び軽鎖の各鎖の 3 つの超可変領域に、N 末端側から、配列番号 1、2 及び 3 ならび  
10 に配列番号 4、5 及び 6 の順でそれぞれ含まれる。超可変領域は、免疫グロブリンの抗体としての特異性、抗原決定基と抗体の結合親和性を決定するものであり、相補性決定部とも呼ばれる。従って、かかる超可変領域以外の領域は他の抗体由来であっても構わない。すなわち、抗原との結合活性（反応性）を損なわない範囲で一部のアミノ酸を置換、挿入、削除あるいは追加する等の改変を行ったものも本発明において  
15 使用できるヒトモノクローナル抗体に含まれる。

より具体的には、配列表の配列番号 7 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域と、配列表の配列番号 8 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域とを含む抗体、すなわち G A H 抗体が挙げられる。G A H 抗体とは、胃癌及び大腸癌との反応性からスクリーニングされた癌に特異的に結合するヒトモノクローナル抗体であり（特開平 4-346918 号及び特開平 5-304987 号各号公報）、この抗体は、癌患者由来リンパ球とマウスミエローマ  
20 細胞とのハイブリドーマを作製し、上記の特定のアミノ酸配列を有するものを選択することによって得ることができるし、遺伝子工学的な手法により作製することもできる（特開平 5-304987 号公報）。

かかる G A H 抗体においては公知のヒト抗体のアミノ酸配

列におけるシステインの位置と比較して、配列表の配列番号 7 における 32 番目のシステインに特徴がある。即ち、これは分子内でのジスルフィド結合形成には関与しない遊離のシステインと推定される。該システイン残基は配列表の配列番号 1 に示した配列中の 4 番目のアミノ酸に相当し、重鎖の超可変領域に位置することから、抗原との結合活性に関与していると考えられる。

発明の対象となる抗体としては、 $F(ab')_2$  化抗体が最適であるが、ホール抗体（全長抗体、抗体全体）、抗体断片（抗体フラグメント、例えば、 $F(ab')$ 、 $F(ab')_2$ 、 $scFv$ （一本鎖抗体）など）、又は抗体誘導体なども含まれる。

本発明により活性化された蛋白質、とりわけモノクローナル抗体を特に薬剤として用いようとする場合、ホール抗体の他、 $F(ab')_2$  化した抗体を用いる場合も考えられる。

しかしながら、最終目的物である  $F(ab')_2$  化抗体に対して、還元剤、抗酸化剤及び遊離のシステインの修飾を還元しやすくする物質の存在下で本発明の方法を施す場合、2 つの  $F(ab')$  間を架橋するジスルフィド結合部分の結合強度が立体的に弱いことから、本発明の弱い還元条件における処理によっても容易に還元される分子が存在し、このため二分子の  $F(ab')$  が生成されてしまうことが考えられる。このような  $F(ab')$  の生成を避けるため、 $F(ab')_2$  化抗体を最終目的物とする場合は、抗体精製後のホール抗体の段階で本発明の方法を行うことが有効である。すなわち、ホール抗体の段階では  $Fc$  部分の架橋及び立体構造が比較的安定であるため、本発明の方法によって容易に 1 価抗体へと還元はされない。そこでホール抗体の段階で結合活性に関与するチオール基部分のみ活性型に変換し、その後ペプシン消化により  $F(ab')_2$  化を行うことで活性型  $F(ab')_2$  化抗体を取得することに



より、かかる問題点を克服できる。

本発明の方法で得られる蛋白質は、血清培地で得られる蛋白質と同等の理化学的性質又は生物学的性質を有する。

5 本発明において、蛋白質の理化学的性質を測定する方法としてはイオン交換高性能液体クロマトグラフィー（イオン交換 HPLC）を用いることが好ましく、後述する実施例中の条件を用いることがより好ましい。この発明において同等の性質とは、活性のある標準品と比較して、メインのピークが標準品と同等のリテンションタイムに観察されることである。標準品のピークが複数ある場合は、1つ或いは複数のピークが標準品と同等のリテンションタイムに観察されることである。後述の実施例で説明すると、標準品として血清培地で得られた活性のある抗体を用い、GAH 抗体と同等のリテンションタイムにメインのピークが観察されることである。具体的には、  
10 GAH ホール抗体に於いては、後述する第 7 図に示すように約 15.5 分、約 17.5 分、約 22 分にピークが観察されることである。また、 $F(ab')_2$  化 GAH 抗体に於いては、後述する第 12 図に示すように約 15 分、約 17 分、約 21.5 分にピークが観察されることである。このリテンションタイムは  
15 あくまでも目安であり、分析機器の違い等によって変化することは十分に起こり得ることであり、同等性は同条件で分析を実施し、標準品との比較の結果判定されるものである。  
20

本発明において、生物学的性質を測定する方法としては固相酵素免疫検定（ELISA）による結合活性を用いることが好ましく、後述する実施例中の条件を用いることがより好ましい。  
25 この発明において同等の性質とは、標準品と比較して、その活性が 80% 以上、好ましくは 90% 以上、より好ましくは 100% 以上に回復していることである。

本発明は、前述の抗体をはじめ、本発明の方法で得られた

蛋白質を有効成分として含有する医薬、例えば上記物質と薬学的に許容しうる担体とからなる医薬組成物を提供し、種々の形態の治療用製剤を提供する。薬学的に許容しうるとは、悪心、目眩、吐き気等投与に伴う望ましくない副作用、頻回  
5 投与時の製剤に対する免疫応答などがおきないことを意味する。さらに、本発明の蛋白質に例えば毒素等の物質を結合させた抗体も医薬品として使用可能である。例えば、ドキソルビシン等の抗腫瘍剤等の薬剤を封入したりポソーム等に抗体等の蛋白質を結合させたものを挙げることもできる（特開平  
10 4-346918号、特開平 5-304987号及び W000/64413号各号公報）。抗体が結合した腫瘍性物質含有リポソームは、公知の方法、例えば、脱水法（特表平 2-502348号公報）、安定化剤を加え液剤として用いる方法（特開昭 64-9331号公報）、凍結乾燥法（特開昭 64-9931号公報）等により製剤化することができ、  
15 血管内投与、局所投与などの方法で患者に投与することができる。投与量は有効成分の抗腫瘍性物質の種類に応じて適宜選択することができるが、例えばドキソルビシンを封入したりポソームを投与する場合には、有効成分量として 50 mg / kg 以下、好ましくは 10 mg / kg 以下、より好ましくは  
20 5 mg / kg 以下で用いることができる。

### 実施例

以下の実施例により、本発明をさらにより詳細に説明するが、本発明は、その要旨を超えない限り以下の実施例によっ  
25 て限定されるものではない。

実施例 1 無血清培養による GAH 抗体のホール抗体（以下、GAH ホール抗体と称する）の培地中への生産

無血清培地 CD CHO(インビトロジェン社)及び ExCell 325-PF

(J R H 社) 1 L にそれぞれ 4mmol のグルタミン (SIGMA 社)、10mg のインシュリン (SIGMA 社) を溶解し 0.22 $\mu$ m ボトルトップフィルター (コーニング・コースター社) で無菌ろ過を行い細胞培養培地を調製した。調製した細胞培地を予め高压蒸気滅菌器 (サクラ精機社) で滅菌しておいた 1 L スピンナーフラスコ (Belco 社) に無菌的に仕込み培養制御装置 (バイオット社) に設置し、温度 37℃、溶存酸素濃度 3.0mg/l、pH7.4、攪拌回転数 60rpm に調製を行った。

5 予めローラーボトル (Falcon 社) で培養しておいた遺伝子組換 GAH 抗体産生 CHO 細胞 1-6R (特開平 5-304987 号公報実施例参照) にトリプシンを作用させ細胞を剥離し、遠心後上清を廃棄し、それぞれの無血清培地で細胞を 2 回洗浄して、種細胞とした。その後、それぞれの無血清培地に懸濁し、無菌的に 1 L スピンナーフラスコに細胞を播種し、培養を開始した。播種後、サンプリングを行い血球計数盤で生細胞密度、生存率を測定したところ、それぞれ CD CHO :  $1.09 \times 10^5$  cells/ml 82.3%、ExCell325-PF :  $0.87 \times 10^5$  cells/ml 84.1% であった。

15 播種後 353hr で培養を終了し、培養液を回収した。培養液は、遠心 (3000rpm, 20min) 後 0.22 $\mu$ m ボトルトップフィルターでろ過し、約 800ml の未精製バルクを得た。

## 実施例 2 無血清培養により得られた未精製バルクからの GAH ホール抗体の精製

25 実施例 1 で得られた未精製バルクそれぞれ約 800ml をそれぞれ 2 回に分け、XK16 カラム (i.d.16mm、アマシャム・バイオサイエンス社製) に Prosep-A 樹脂 (ミリポア社製) を 14.3ml 充填したカラムクロマトで精製を行った。流速は、14.3ml/min で実施し、アプライ、洗浄は downflow、溶出、再生は upflow

で未精製バルク及び緩衝液をカラムに供給した。洗浄、溶出、再生の緩衝液組成は、40mM NaClを含む 40mM 酢酸緩衝溶液であり pH はそれぞれ 6.0、4.0、2.7 である。

- 5 CD CHO、ExCell325-PF の未精製バルクより、それぞれ 47.2ml、50.8ml のホール抗体含有液 (pH4.0) を得た。この溶液の抗体含有量は、紫外吸光度法で測定を行ったところそれぞれ 57mg、48mg であった。

上記で述べた G A H 抗体の無血清培養工程を第 1 図に示す。

#### 10 実施例 3 G A H ホール抗体の H P L C による分析

- CD CHO 培地で生産された G A H ホール抗体約 10  $\mu$  l (50  $\mu$  g 相当) に最終 0.1mM L-システインを含む 30mM トリス塩酸緩衝液 (pH9) なる組成になる様に試薬を添加し、約 40  $\mu$  l にした。この液を室温にて 16 時間放置した後、トリフルオロ酢酸
- 15 を加えて pH4 にした。マイクロコン YM-10 (アミコン社) で濃縮し、液組成を 0.05% 酢酸に置換した。この液を TSKgel CM-5PW (内径 7.5 mm, 長さ 7.5 cm; 東ソー社品) に供して陽イオン交換液体クロマトグラフ法を行った。

操作条件：

- 20 検出器：紫外吸光光度計 (測定波長 280nm)  
カラム：TSKgel CM-5PW (内径 7.5mm×長さ 7.5cm) 東ソー社品  
カラム温度：30℃ 付近の一定温度  
流量：1.0ml/min
- 25 移動相 A：50mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH7.0)  
移動相 B：50mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH7.0) / 0.5M 塩化ナトリウム  
移動相の送液：濃度勾配制御 (以下、表 1)  
<表 1>

注入後からの時間(分)	移動相 A (%)	移動相 B (%)
0 ~ 4 0	1 0 0 → 5 0	0 → 5 0
4 0 ~ 4 1	5 0 → 1 0 0	5 0 → 0

結果を第 2 図に示した。クロマトグラムは 22.1 分のピークを頂点とするブロードな山となっており、後述の図 9 と比較すると還元剤（システイン）だけでも反応は進行していると考えられる。

#### 実施例 4 G A H ホール抗体の H P L C による分析

CD CHO 培地で生産された G A H ホール抗体約 10  $\mu$  l (50  $\mu$  g 相当) に最終 1mM L - システイン及び 3 mM アスコルビン酸を含む 30mM トリス塩酸緩衝液 (pH9) なる組成になる様に試薬を添加し、約 80  $\mu$  l にした。この液を室温にて 16 時間放置した後、トリフルオロ酢酸を加えて pH4 にした。マイクロコン YM-10 で濃縮し、液組成を 0.05% 酢酸に置換した。この液を TSKgel CM-5PW に供して陽イオン交換液体クロマトグラフ法を行った。操作条件は実施例 3 と同様である。

結果を第 3 図に示した。クロマトグラムは 22.1 分のピークが頂点となっているが前にもブロードな山がある。後述の図 9 と比較すると還元剤（システイン）及び抗酸化剤（アスコルビン酸）だけでも反応は進行していると考えられる。

20

#### 比較例 1 G A H ホール抗体の H P L C による分析

ExCell 325-PF 培地で生産された G A H ホール抗体約 10  $\mu$  l (50  $\mu$  g 相当) に最終 0.8M グアニジン塩酸を含む 30mM トリス塩酸緩衝液 (pH9) なる組成になる様に試薬を添加し、約 80  $\mu$  l にした。この液を室温にて 16 時間放置した後、トリフルオロ酢酸を加えて pH4 にした。マイクロコン YM-10 で濃縮し、液組成を 0.05% 酢酸に置換した。この液を TSKgel CM-5PW

に供して陽イオン交換液体クロマトグラフ法を行った。操作条件は実施例 3 と同様である。

結果を第 4 図に示した。クロマトグラムは特にピークが見られないブロードな山となっており、グアニジン塩酸によって分解物が生成されたことが想定された。

#### 実施例 5 G A H ホール抗体の H P L C による分析

ExCell1325-PF 培地で生産された G A H ホール抗体約  $10\mu\text{l}$  ( $50\mu\text{g}$  相当) に最終  $2.5\text{M}$  塩化ナトリウムを含む  $30\text{mM}$  トリス塩酸緩衝液 ( $\text{pH}9$ ) なる組成になる様に試薬を添加し、約  $90\mu\text{l}$  にした。この液を室温にて 16 時間放置した後、トリフルオロ酢酸を加えて  $\text{pH}4$  にした。マイクロコン YM-10 で濃縮し、液組成を  $0.05\%$  酢酸に置換した。この液を TSKgel CM-5PW に供して陽イオン交換液体クロマトグラフ法を行った。操作条件は実施例 3 と同様である。

結果を第 5 図に示した。クロマトグラムは  $23.4$  分ピークを頂点とするブロードな山であった。頂点の高さは比較例 1 のグアニジン塩酸のみより高く、塩化ナトリウムの添加により強い変性剤と比較して分解生成物は起きにくいことが示唆された。

#### 実施例 6 G A H ホール抗体の H P L C による分析

ExCell1325-PF 培地で生産された G A H ホール抗体約  $10\mu\text{l}$  ( $50\mu\text{g}$  相当) に最終  $15\text{mM}$  アスコルビン酸及び  $3\text{M}$  塩化ナトリウムを含む  $30\text{mM}$  トリス塩酸緩衝液 ( $\text{pH}9$ ) なる組成になる様に試薬を添加し、約  $140\mu\text{l}$  にした。この液を室温にて 16 時間放置した後、トリフルオロ酢酸を加えて  $\text{pH}4$  にした。マイクロコン YM-10 で濃縮し、液組成を  $0.05\%$  酢酸に置換した。この液を TSKgel CM-5PW に供して陽イオン交換液体クロマト

グラフ法を行った。操作条件は実施例 3 と同様である。

結果を第 6 図に示した。クロマトグラムは 22.7 分ピークを  
頂点とするが前にもブロードな山があり、後述の第 11 図と  
比較すると抗酸化剤（アスコルビン酸）及び塩化ナトリウム  
5 だけでも反応は進行していると考えられる。

#### 実施例 7 G A H ホール抗体の活性化処理

実施例 2 により取得した、CD CHO 培地及び EXCELL325-PF  
培地それぞれを用いた G A H ホール抗体溶液各々 20mg を セ  
10 ントリコン 30（アミコン社）を用いて約 1.7mL に濃縮した。  
この液 250  $\mu$ L（3 mg 相当）に最終 1.6M 塩化ナトリウム、2  
mM L-シス테인、12mM アスコルビン酸を含む 30mM トリス  
塩酸緩衝液（pH9）なる組成になる様に試薬を添加し、約 10ml  
15 にした。この液を室温にて 16 時間放置した後、トリフルオロ  
酢酸を加えて pH4 にした。セントリコン 30 で濃縮し、液組  
成を 0.05% 酢酸に置換した。

#### 実施例 8 G A H ホール抗体の H P L C による分析

実施例 7 で得られた溶液を用いて陽イオン交換液体クロマ  
20 トグラフ法を行い実施例 7 の処理を行わなかった試料のクロ  
マトグラムと比較した。操作条件は実施例 3 と同様である。

結果を第 7 図から第 11 図に示した。

その結果、実施例 7 の処理（以下、「本発明の方法」と称す  
る場合もある）を施さない G A H ホール抗体のクロマトグラ  
25 ムでは第 8 図及び第 10 図に示す様にヘテロジェナイティに  
由来する数多くの分子種が存在し、保持時間も全体に早い。  
他方、本発明の方法を施した後のクロマトグラムでは第 9 図  
及び第 11 図に示す様にいずれも保持時間 22.6 分にメイン  
ピークが認められる。このピークは結合活性を有する血清入

り培養 G A H ホール抗体の結果を示す第 7 図の 22.1 分に見られるピークに相当すると考えられ、本発明の方法においては活性型に相当する分子種への変換が良好に進んでいると考えられる。尚、第 7 図に示した様に従来の血清入り培養で得られる活性型の G A H ホール抗体でも数本のヘテロジェナ  
5 ティ分子種が認められる。

#### 実施例 9 G A H ホール抗体の結合活性測定

実施例 2 及び実施例 7 で得られた G A H ホール抗体の結合  
10 活性の測定は、MKN45 細胞固定化プレートを用いたエライザ法により行った。すなわち、MKN45 胃癌細胞株（内藤ら、癌と化学療法、5, 89, 1978、免疫生物研究所から入手）を細胞培養用 96 穴プレートの各ウェルに約  $4 \times 10^4$  / mL となるように加えた後 2 日間培養し、パラホルムアルデヒド溶液により固  
15 定化したプレートを用意した。このプレートに段階希釈した G A H ホール抗体を加え、37℃ 2 時間静置した。洗浄後、各ウェルに西洋ワサビ・ペルオキシダーゼ標識ヤギ抗ヒト I g G 抗体を加えて 37℃ 1 時間静置した後、o - フェニレンジアミン溶液を加えて発色させた。2 M 硫酸で反応停止後、イム  
20 ノリーダーを用いて波長 490nm と 650nm の吸光度の差を求めた。希釈した血清入り培養 G A H ホール抗体の検量線を作成し、それを基準として同一濃度の試料溶液の吸光度との割合から力価を算出した。結果を表 2 に示した。表 2 は、G A H ホール抗体での結合活性を示す表であり、血清入り培養 G A  
25 H ホール抗体（第 7 図に相当する試料）の結合活性を 100% として表した。また、相当する試料のイオン交換 HPLC の図番号を表中の括弧内に示した。

本発明を施さない G A H ホール抗体では結合活性は 70% 前後と低い、本発明の方法処理を施すことにより活性が



100%以上へと良好に回復している。

<表 2>

処理 培地	実施例 7 の処理を 施さない試料	実施例 7 の処理を 施した試料
CD CHO	7 0 % (第 8 図の試料)	1 1 7 % (第 9 図の試料)
ExCell32 5-PF	6 9 % (第 1 0 図の試料)	1 3 1 % (第 1 1 図の試料)

5 実施例 1 0 活性化処理後のホール抗体のペプシン消化による F (ab')<sub>2</sub> 化及び精製

実施例 2 で得られた溶液のうち、それぞれ 25ml づつを実施例 7 の活性化処理を行わずにペプシン消化を行った。すなわちペプシン (SIGMA 社) を 1.2mg/g-GAH となる様に加えて、マイレクスフィルター (ミリポア社、0.22 μm) で無菌濾過し、  
10 37℃で加温しながら穏やかに 17 時間攪拌を行った。

一方、実施例 7 で得られた活性化処理済試料は、pH を 4.0 に調整後、同様にペプシン消化を行った。

ペプシン消化後陽イオン交換カラムクロマト法を用いて G A H F (ab')<sub>2</sub> 化抗体を精製した。すなわち、XK16 カラムに  
15 陽イオン交換樹脂 SP-Sephrose FF (アマシャム・バイオサイエンス社) を 15.3ml 充填し、ペプシン消化後の抗体含有液を供した。その後、20mM NaCl 含有 40mM 酢酸緩衝液 (pH4.0) で洗浄を行い、塩濃度を徐々に高めながら、抗体のピークを分取した。流速は、1.58ml/min である。活性化処理無しの CD CHO、  
20 ExCell325-PF の試料の体積はそれぞれ 12.5ml、21.8ml であり、活性化処理有りの CD CHO、ExCell325-PF の試料はそれぞれ 10.5ml、11.6ml であった。

上記で述べた G A H ホール抗体の精製後の活性化処理、ペプシン消化及び F(ab')<sub>2</sub> 化抗体の精製工程を第 1 図に示す。

実施例 11 F(ab')<sub>2</sub> 化 G A H 抗体の H P L C による分析  
実施例 10 により得られた F(ab')<sub>2</sub> 化 G A H 抗体を、セ  
ントリコン 30 を用いて濃縮、脱塩し 0.05% 酢酸溶液に置換  
5 した。この液を TSKgel CM-5PW (内径 7.5 mm, 長さ 7.5 cm;  
東ソー社品) に供して陽イオン交換液体クロマトグラフ法を  
行なった。溶出条件は実施例 3 と同様である。そして、実施例  
7 の処理のみを行わずに F(ab')<sub>2</sub> まで調製した試料のクロ  
マトグラムと比較した。すなわち緩衝液 (50mM リン酸ナトリ  
10 ウム緩衝液 (pH7.0)) で平衡化した上記カラムに各試料を供し  
た後、0.5M NaCl を含む緩衝液で溶出した。CD CHO 培地及び  
EXCELL325-PF 培地それぞれについて培養、精製した F(ab')  
2 化 G A H 抗体について、実施例 7 の処理を行った試料と行  
っていない試料を比較した結果を第 12 図から第 16 図に示  
15 した。

本発明の方法を施さない G A H ホール抗体から作製した F  
(ab')<sub>2</sub> 化抗体のクロマトグラムでは第 13 図及び第 15 図  
に示す様にヘテロジェナイティに由来する数多くの分子種が  
存在し、保持時間も全体に早い。他方、本発明の方法を施し  
20 た後の G A H ホール抗体から第 1 図に従って作製した F  
(ab')<sub>2</sub> 化抗体のクロマトグラムでは第 14 図及び第 16 図  
に示す様に保持時間 21.6 分にメインピークが認められる。こ  
のピークは結合活性を有する血清入り培養 G A H ホール抗体  
から作製した F(ab')<sub>2</sub> 化抗体でも第 12 図の 21.7 分に見  
25 られるピークに相当すると考えられ、変換された活性型に相  
当する分子種は、その後に行うペプシン消化、カラム精製な  
どの工程でも良好に維持されていると考えられる。尚、第 1  
2 図に示した様に従来の血清入り培養で得られる活性型の F  
(ab')<sub>2</sub> 化 G A H 抗体では数本のヘテロジェナイティ分子種

が認められるが、第 1 4 図及び第 1 6 図に示したクロマトグラムでも同様のパターンを示した。

#### 実施例 1 2 $F(ab')_2$ 化 G A H 抗体の結合活性測定

5 実施例 1 0 で得られた  $F(ab')_2$  化 G A H 抗体結合活性の測定を、実施例 9 に記載の方法に従って行った。

結果を表 3 に示した。表 3 は、 $F(ab')_2$  化 G A H 抗体での結合活性を示す表であり、血清入り培養  $F(ab')_2$  化 G A H 抗体（第 1 2 図に相当する試料）の結合活性を 1 0 0 % として表した。また、相当する試料のイオン交換 HPLC の図番号を表中の括弧内に示した。

本発明の方法を施さない G A H ホール抗体からペプシン処理により得られる  $F(ab')_2$  化 G A H 抗体では結合活性は 60% 前後と低い。他方、本発明の方法の処理を施した G A H  
15 ホール抗体から同様の処理により得られる  $F(ab')_2$  化 G A H 抗体は、ペプシン消化、イオン交換カラムでの精製などを経ても結合活性が再び低下することなく、100% 以上へと良好に回復しており、ホール抗体の段階で回復が確認された活性が良好に維持されている。

20 < 表 3 >

処理 培地	実施例 7 の処理を施さない、実施例 1 0 で得た試料	実施例 7 の処理を施した、実施例 1 0 で得た試料
CD CHO	6 2 % (第 1 3 図の試料)	1 0 5 % (第 1 4 図の試料)
ExCell325-PF	6 0 % (第 1 5 図の試料)	1 1 0 % (第 1 6 図の試料)

#### 実施例 1 4 L-システインの無血清培地への添加による G A H ホール抗体の培地中への生産

無血清培地 ExCell325-PF (J R H 社) 1 L に 4mmol のグル

- タミン (SIGMA 社)、10mg のインシュリン (SIGMA 社) を溶解し 0.22  $\mu$ m ボトルトップフィルター (コーニング・コースター社) で無菌ろ過を行い細胞培養培地を調整した。予め滅菌しておいた 4 基の 250ml spinner flask (ヘルコ社) に無機的に
- 5 分取し、そこに無菌的に L-システインをそれぞれ 0mM、1mM、5mM、10mM になるよう添加した。細胞は、実施例 1 と同様の方法で調整し、各スピナーフラスコに  $8.27 \times 10^5$  cells/ml の密度で播種を行った。その後、37℃、40rpm の条件で培養を 256hr 実施した。培養液は、遠心 (3000rpm, 20min) 後 0.22  $\mu$ m ボトルトップフ
- 10 ルターでろ過し、それぞれ約 140ml の未精製バルクを得た。その後、未精製バルクを実施例 2 と同様の方法でそれぞれアフィニティ-精製し、0.22  $\mu$ m ボトルトップフィルターで無菌ろ過を行った。この抗体精製溶液を用いて実施例 4 で示した HPLC による分析を行った。
- 15 結果を第 17 図から第 20 図に示す。L-システインを無血清培地中に加えなかった抗体のクロマトグラム (第 17 図) は、アフィニティ-精製後本発明の処理を加えなかったもの (第 8 図及び第 10 図) と同等であり抗体活性が低いと推定される。しかし、培地中に L-システインを加えたクロマトグラム (第 18 図から第 20 図) は、
- 20 血清入り培養を行ったクロマトグラム (第 7 図) と同等の位置にピークが存在し、抗体活性を有するものと推測される。したがって、無血清培地に L-システインを添加し培養することによって、抗体活性が比較的高い抗体が得られることがわかる。

## 25 産業上の利用可能性

本発明の方法によれば、遊離のシステインを有する蛋白質を無血清培地で活性型として生産することが可能である。

尚、本出願は、日本特許出願 特願 2001-37054

1 号を優先権主張して出願されたものである。

## 請求の範囲

1. 遊離のシステインを有する蛋白質を無血清培地を用いて生産する方法であって、遊離のシステインを有する蛋白質が  
5 活性化されて生産されることを特徴とする方法。
2. 蛋白質生産時の蛋白質分子内のジスルフィド結合を還元せず、かつ、遊離のシステインの修飾を還元するのに十分な還元剤の存在下に行われることを特徴とする請求項 1 に記載  
10 の方法。
3. 還元剤が、システインであることを特徴とする請求項 2 に記載の方法。
- 15 4. 抗酸化剤の存在下に行われることを特徴とする請求項 1 から 3 のいずれかに記載の方法。
5. 抗酸化剤が、蛋白質間の遊離のシステインを介した重合化を抑制するのに十分な抗酸化剤であることを特徴とする請求  
20 項 4 に記載の方法。
6. 抗酸化剤が、アスコルビン酸であることを特徴とする請求項 4 又は 5 に記載の方法。
- 25 7. 遊離のシステインの修飾を還元しやすくする物質の存在下に行われることを特徴とする請求項 1 から 6 のいずれかに記載の方法。
8. 遊離のシステインの修飾を還元しやすくする物質が、塩

化ナトリウム又は塩化カリウムであることを特徴とする請求項 7 に記載の方法。

5 9. 蛋白質が、ジスルフィド結合を形成していない遊離のシステインを分子内に有し、かつシステインのチオール基が結合活性に関与している蛋白質であることを特徴とする請求項 1 から 8 のいずれかに記載の方法。

10 10. 蛋白質が、組換え体蛋白質であることを特徴とする請求項 1 から 9 のいずれかに記載の方法。

11. 蛋白質が、抗体である請求項 1 から 10 のいずれかに記載の方法。

15 12. 抗体が、抗体の可変領域に遊離のシステインを有する抗体であることを特徴とする請求項 11 に記載の方法。

13. 抗体が、ヒトモノクローナル抗体であることを特徴とする請求項 11 又は 12 に記載の方法。

20

14. ヒトモノクローナル抗体が、重鎖の超可変領域に、配列表の配列番号 1、2 及び 3 のアミノ酸配列を含み、軽鎖の超可変領域に、配列表の配列番号 4、5 及び 6 のアミノ酸配列を含む抗体であることを特徴とする請求項 13 に記載の方法。

25

15. ヒトモノクローナル抗体が、配列表の配列番号 7 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域と、配列表の配列番号 8 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域とを含む抗体であることを特

徴とする請求項 13 又は 14 に記載の方法。

16. 抗体が、 $F(ab')_2$  化抗体であることを特徴とする請求項 11 から 15 のいずれかに記載の方法。

5

17. 請求項 1 から 16 のいずれかに記載の方法を用いて、蛋白質を無血清培地を用いた培養によって生産する方法。

10 18. 蛋白質が、ジスルフィド結合を形成していない遊離のシステインを分子内に有し、かつシステインのチオール基が結合活性に関与している蛋白質であることを特徴とする請求項 17 に記載の方法。

15 19. 蛋白質が、組換え体蛋白質であることを特徴とする請求項 17 又は 18 に記載の方法。

20. 蛋白質が、抗体であることを特徴とする請求項 17 から 19 のいずれかに記載の方法。

20 21. 抗体の可変領域に遊離のシステインを有することを特徴とする請求項 20 に記載の方法。

22. 抗体が、ヒトモノクローナル抗体であることを特徴とする請求項 20 又は 21 に記載の方法。

25

23. 抗体が、重鎖の超可変領域に、配列表の配列番号 1、2 及び 3 のアミノ酸配列を含み、軽鎖の超可変領域に、配列表の配列番号 4、5 及び 6 のアミノ酸配列を含む抗体であることを特徴とする請求項 20 から 22 のいずれかに記載の方



法。

24. 抗体が、配列表の配列番号7のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域と、配列表の配列番号8のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域とを含む抗体であることを特徴とする請求項20から23に記載の方法。

25. 抗体が、 $F(ab')_2$ 化抗体であることを特徴とする請求項20から24のいずれかに記載の方法。

10

26. 不活性型として生産された遊離のシステインを有する蛋白質を活性化する方法であって、還元剤、抗酸化剤及び遊離のシステインの修飾を還元しやすくする物質の存在下に行われることを特徴とする方法。

15

27. 生産された蛋白質の蛋白質分子内のジスルフィド結合を還元せず、かつ、遊離のシステインの修飾を還元するのに十分な還元剤の存在下に行われることを特徴とする請求項26に記載の方法。

20

28. 還元剤が、システインであることを特徴とする請求項26又は27に記載の方法。

29. 抗酸化剤が、蛋白質間の遊離のシステインを介した重合化を抑制するのに十分な抗酸化剤であることを特徴とする請求項26に記載の方法。

30. 抗酸化剤が、アスコルビン酸であることを特徴とする請求項26又は29のいずれかに記載の方法。

3 1 . 遊離のシステインの修飾を還元しやすくする物質が、塩化ナトリウム又は塩化カリウムであることを特徴とする請求項 2 6 に記載の方法。

5

3 2 . 蛋白質が、ジスルフィド結合を形成していない遊離のシステインを分子内に有し、かつシステインのチオール基が結合活性に関与している蛋白質であることを特徴とする請求項に 2 6 から 3 1 のいずれかに記載の方法。

10

3 3 . 蛋白質が、組換え体蛋白質であることを特徴とする請求項 2 6 から 3 2 のいずれかに記載の方法。

15

3 4 . 蛋白質が、抗体である請求項 2 6 から 3 3 のいずれかに記載の方法。

3 5 . 抗体が、抗体の可変領域に遊離のシステインを有する抗体であることを特徴とする請求項 3 4 に記載の方法。

20

3 6 . 抗体が、ヒトモノクローナル抗体であることを特徴とする請求項 3 4 又は 3 5 に記載の方法。

25

3 7 . ヒトモノクローナル抗体が、重鎖の超可変領域に、配列表の配列番号 1 、 2 及び 3 のアミノ酸配列を含み、軽鎖の超可変領域に、配列表の配列番号 4 、 5 及び 6 のアミノ酸配列を含む抗体であることを特徴とする請求項 3 6 に記載の方法。

3 8 . ヒトモノクローナル抗体が、配列表の配列番号 7 のア

ミノ酸配列を含む重鎖可変領域と、配列表の配列番号 8 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域とを含む抗体であることを特徴とする請求項 36 又は 37 に記載の方法。

- 5     39. 抗体が  $F(ab')_2$  化抗体であることを特徴とする請求項 34 から 38 のいずれかに記載の方法。

- 10    40. 還元剤、抗酸化剤及び遊離のシステインの修飾の還元をしやすい物質の添加を、抗体精製後のホール抗体存在時に行うことを特徴とする請求項 26 から 39 のいずれかに記載の方法。

41. 請求項 1 から 40 のいずれかに記載の方法により得られた蛋白質。

15

42. 蛋白質が、血清培地で得られる蛋白質と同等の理化学的性質又は生物学的性質を示すことを特徴とする請求項 41 に記載の蛋白質。

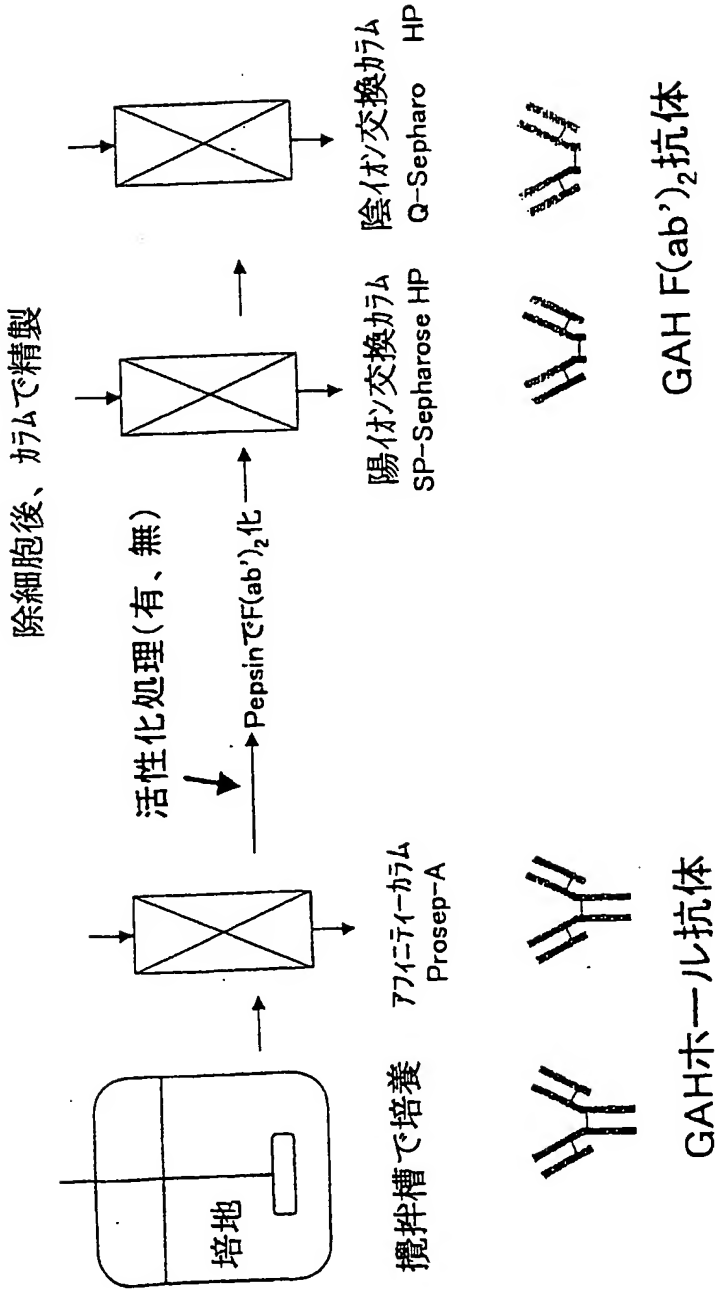
- 20    43. 請求項 41 又は 42 に記載の蛋白質を含む医薬組成物。

44. 抗腫瘍剤であることを特徴とする請求項 43 に記載の医薬組成物。

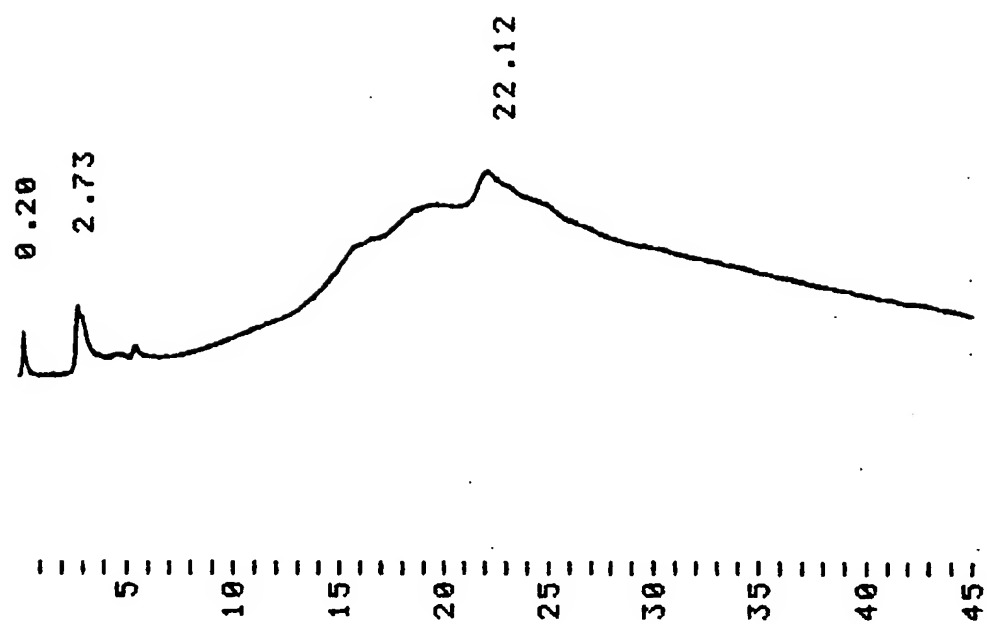
25

第1図

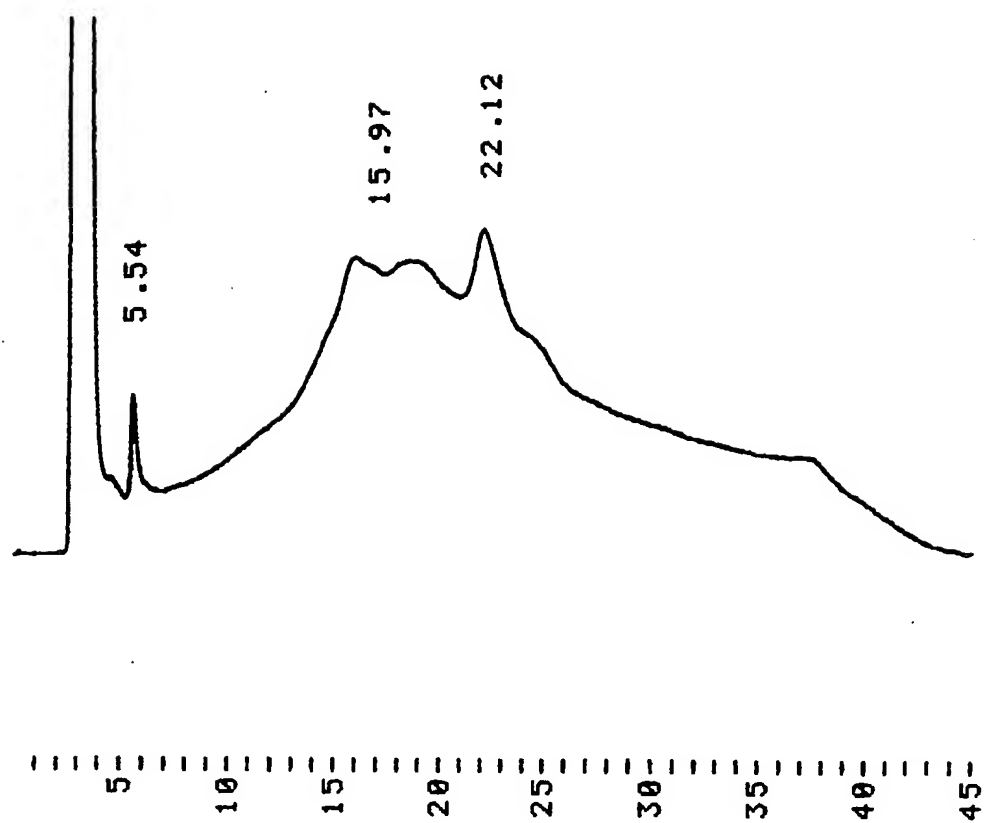
GAH抗体の製造方法



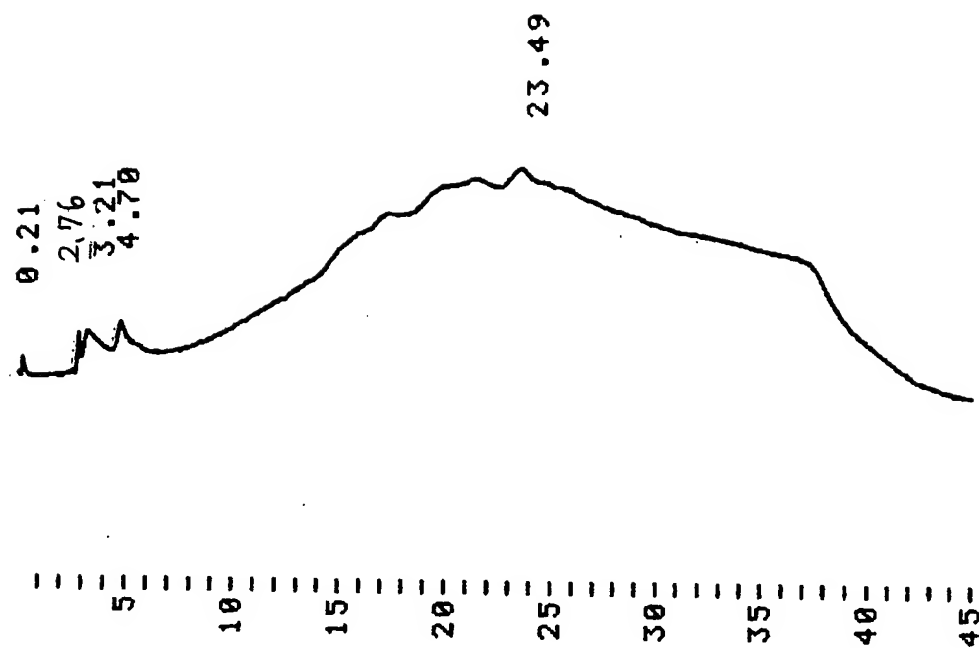
第2図



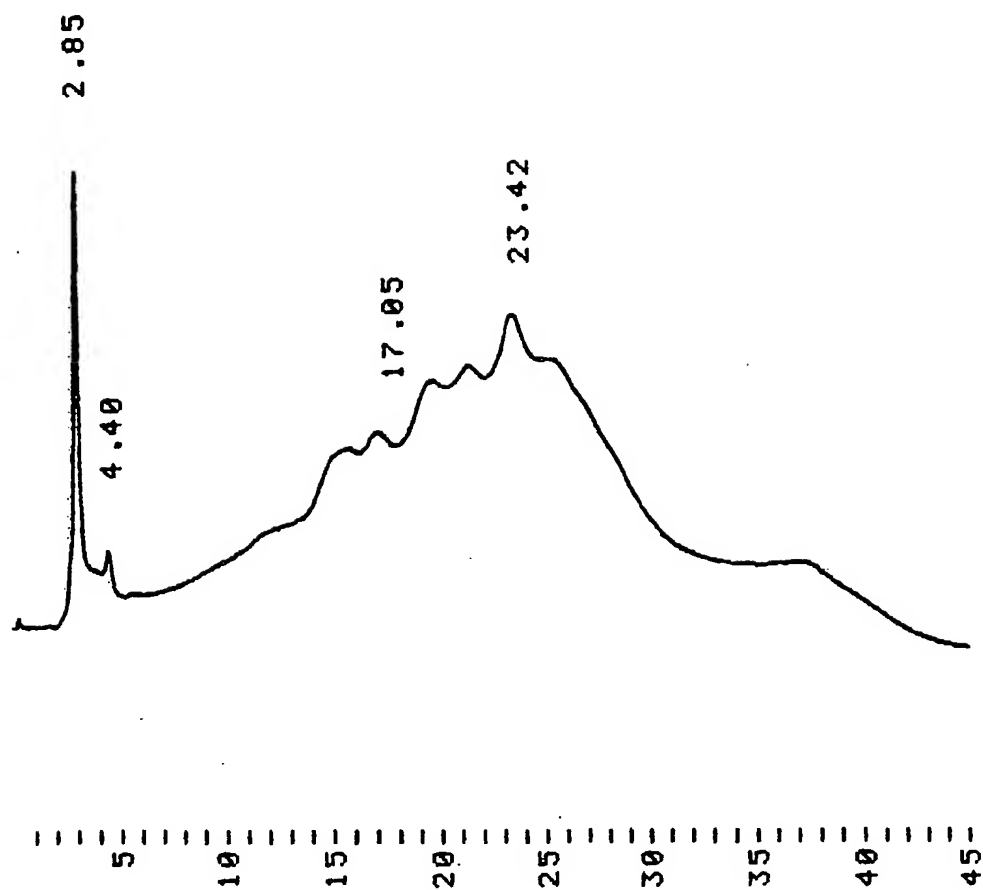
第3図



第4図

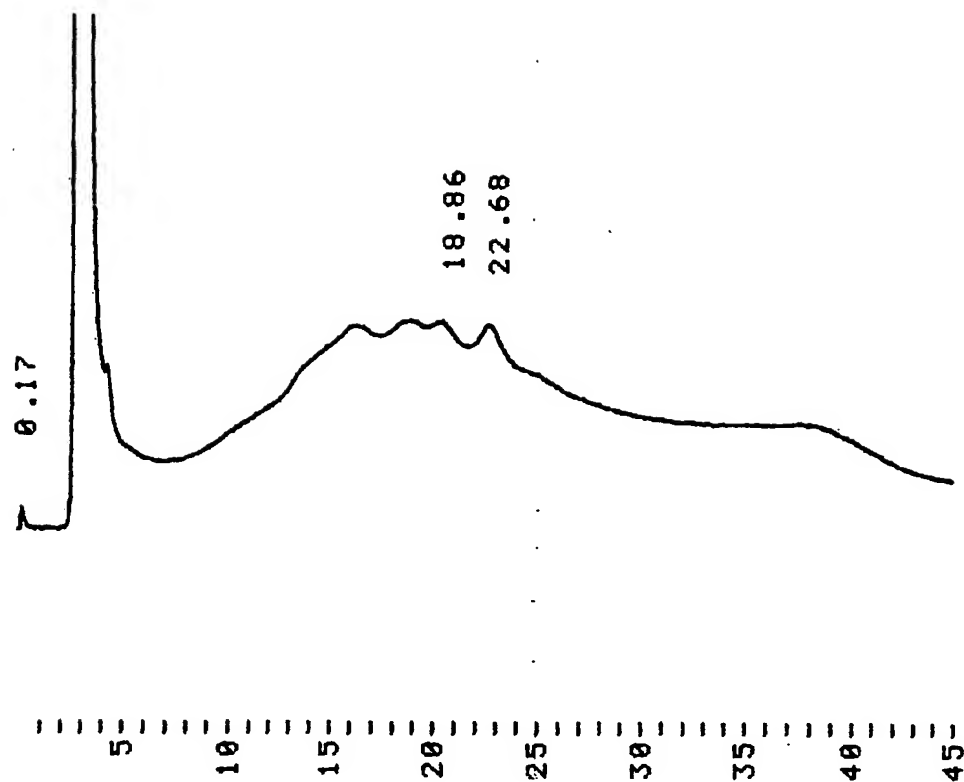


第5図

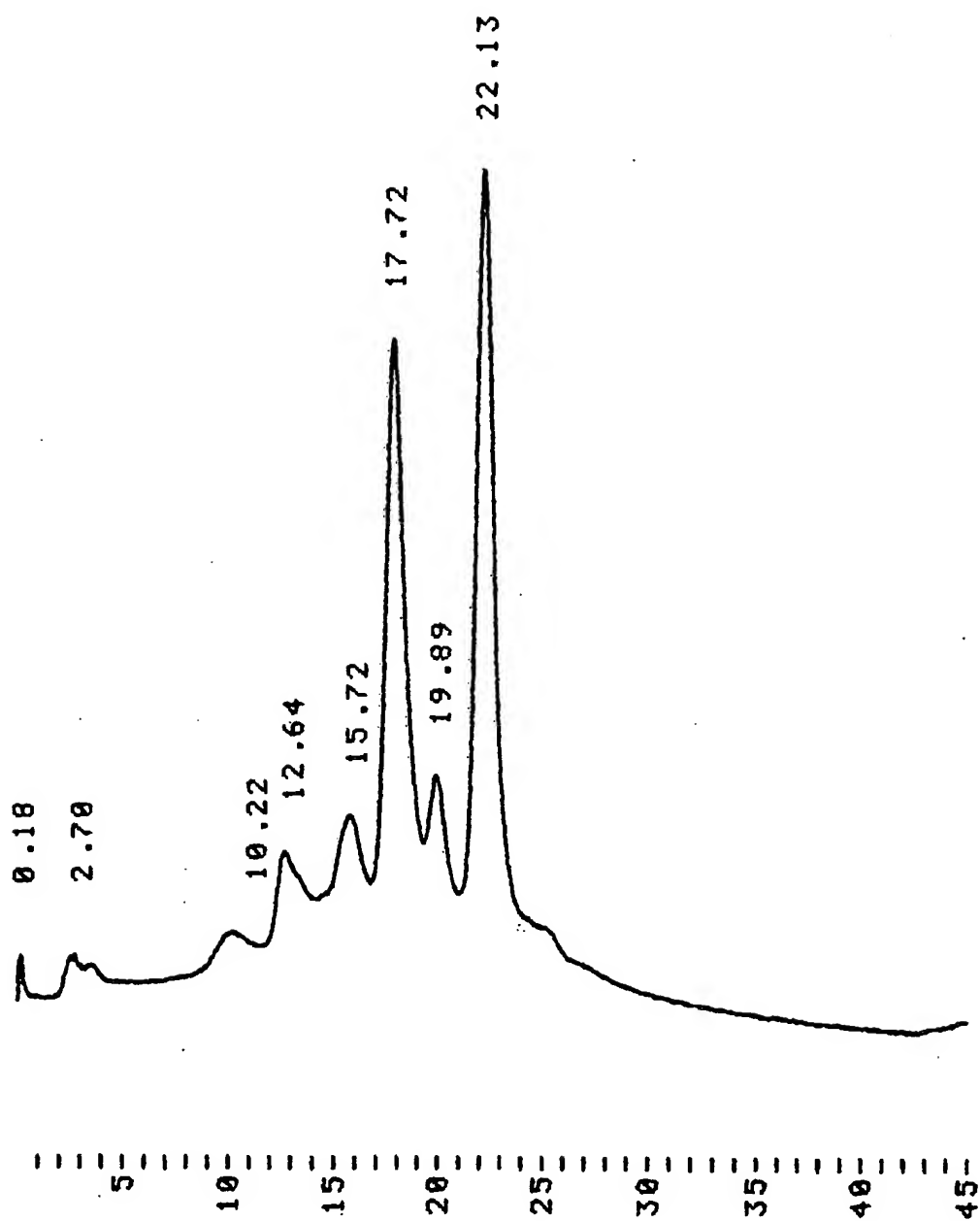




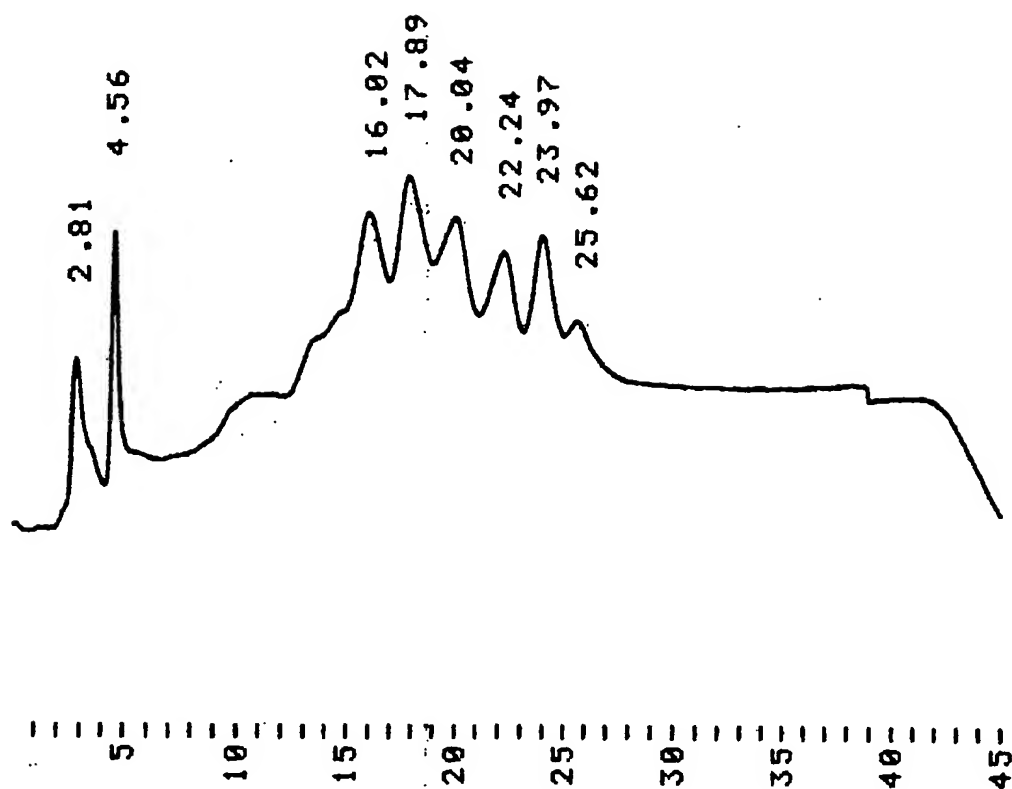
第6図



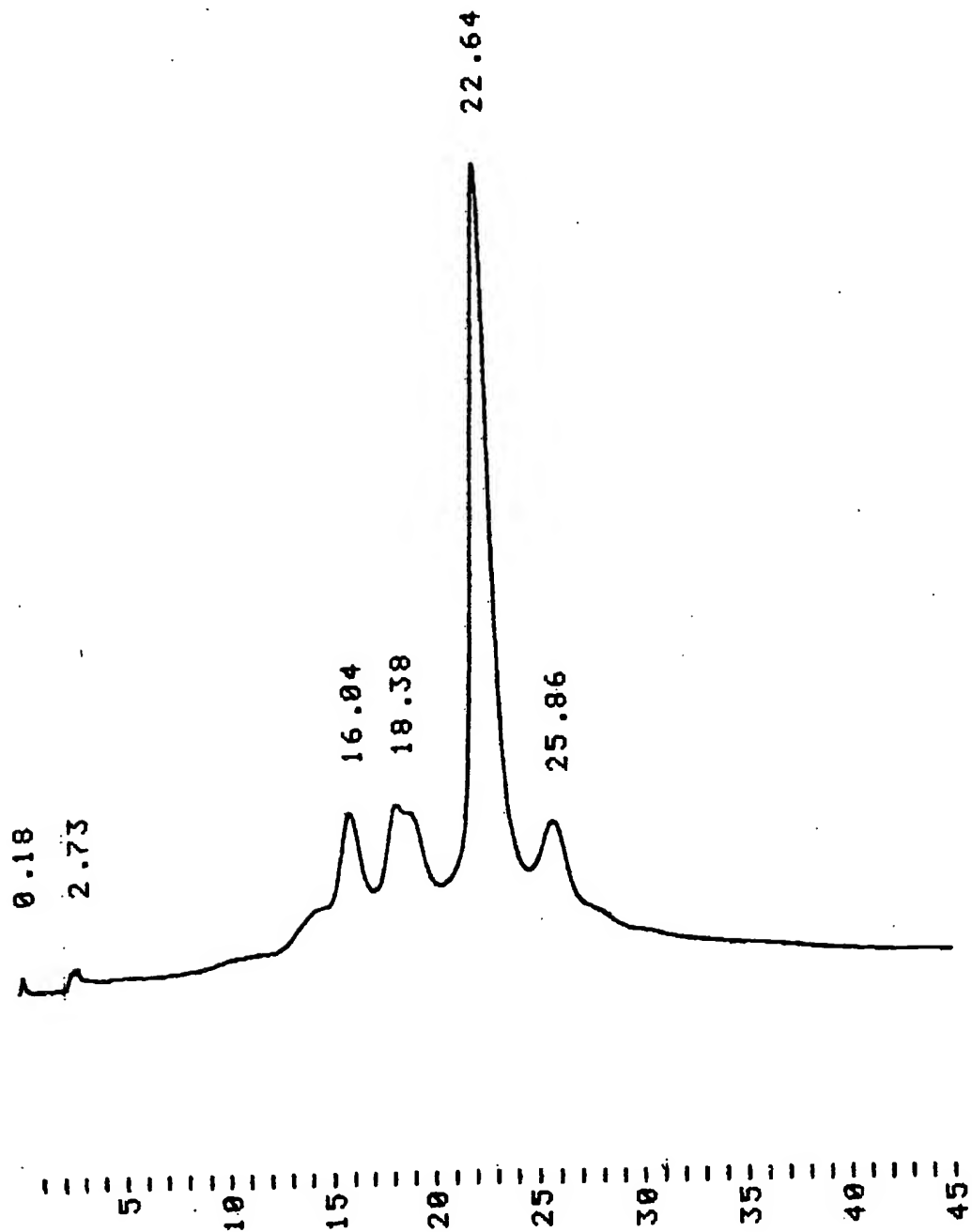
第7図



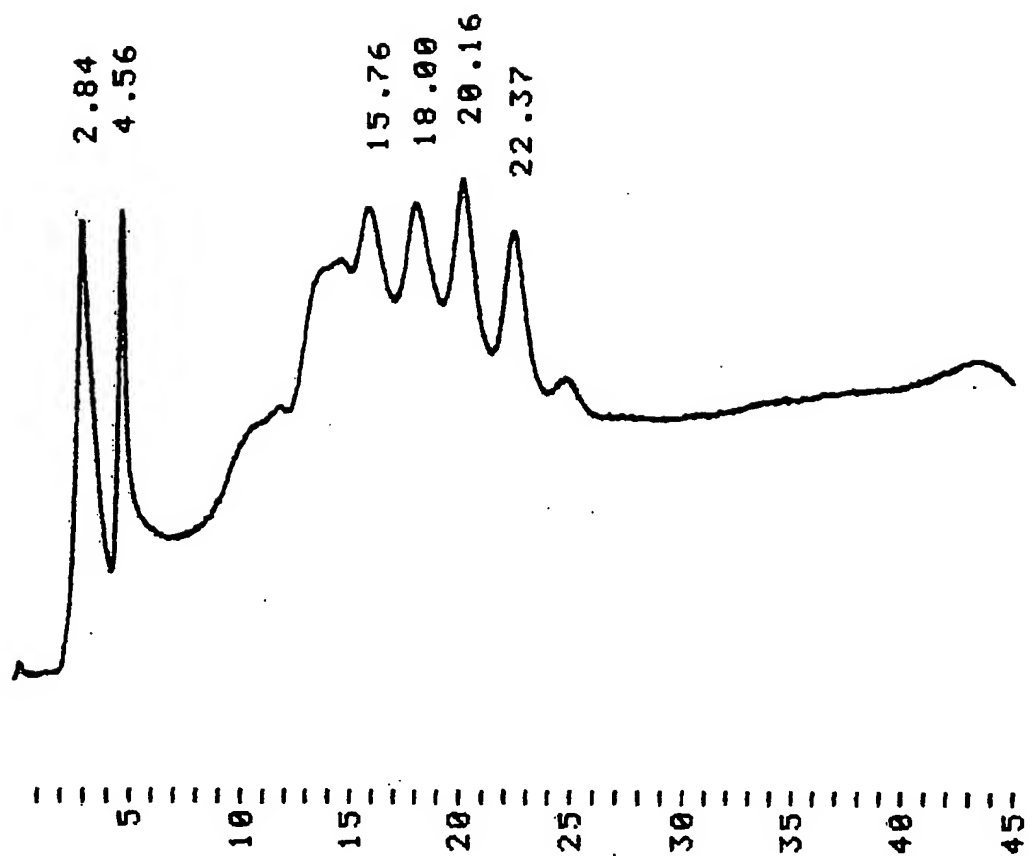
第 8 図



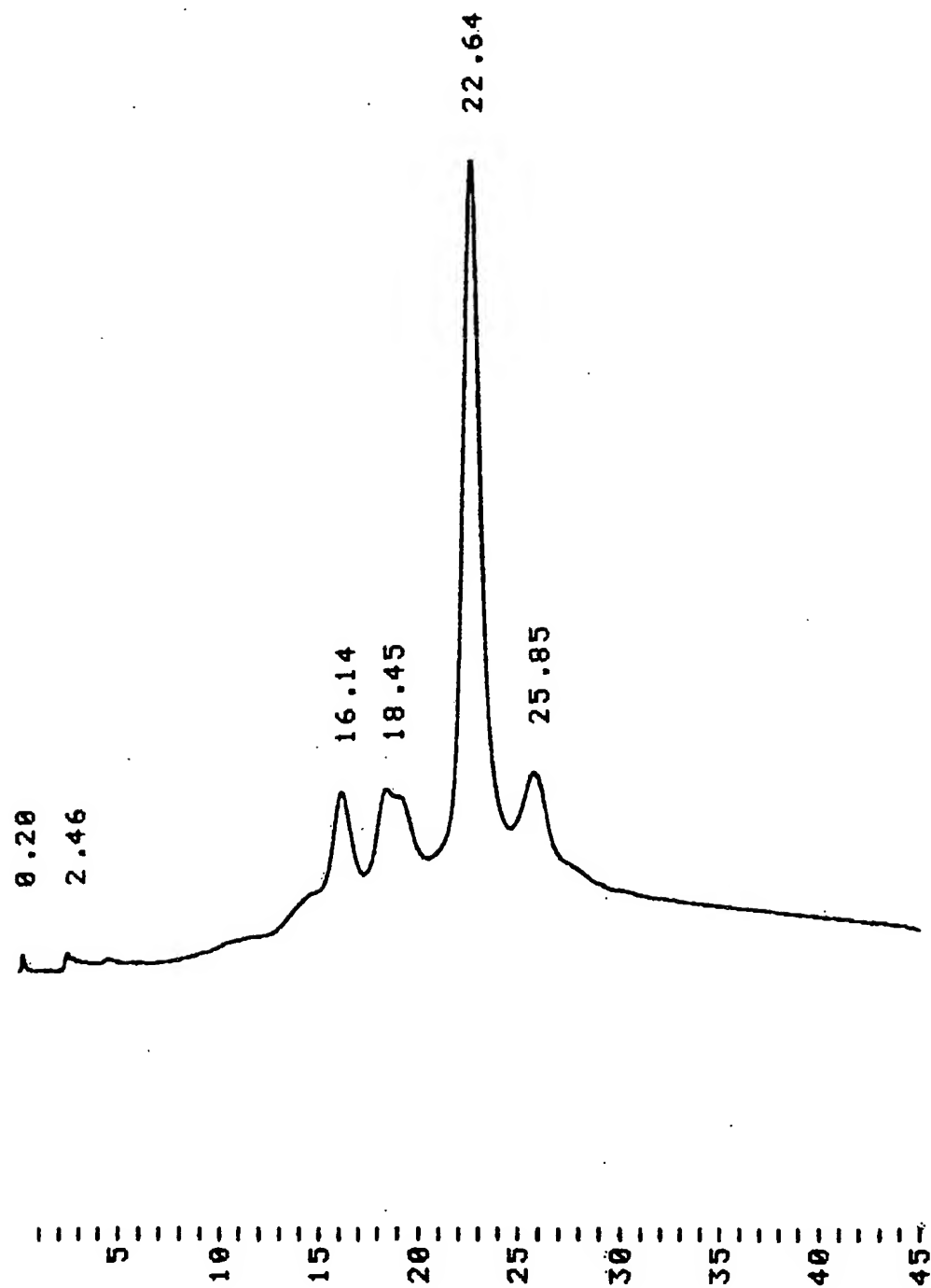
第 9 図



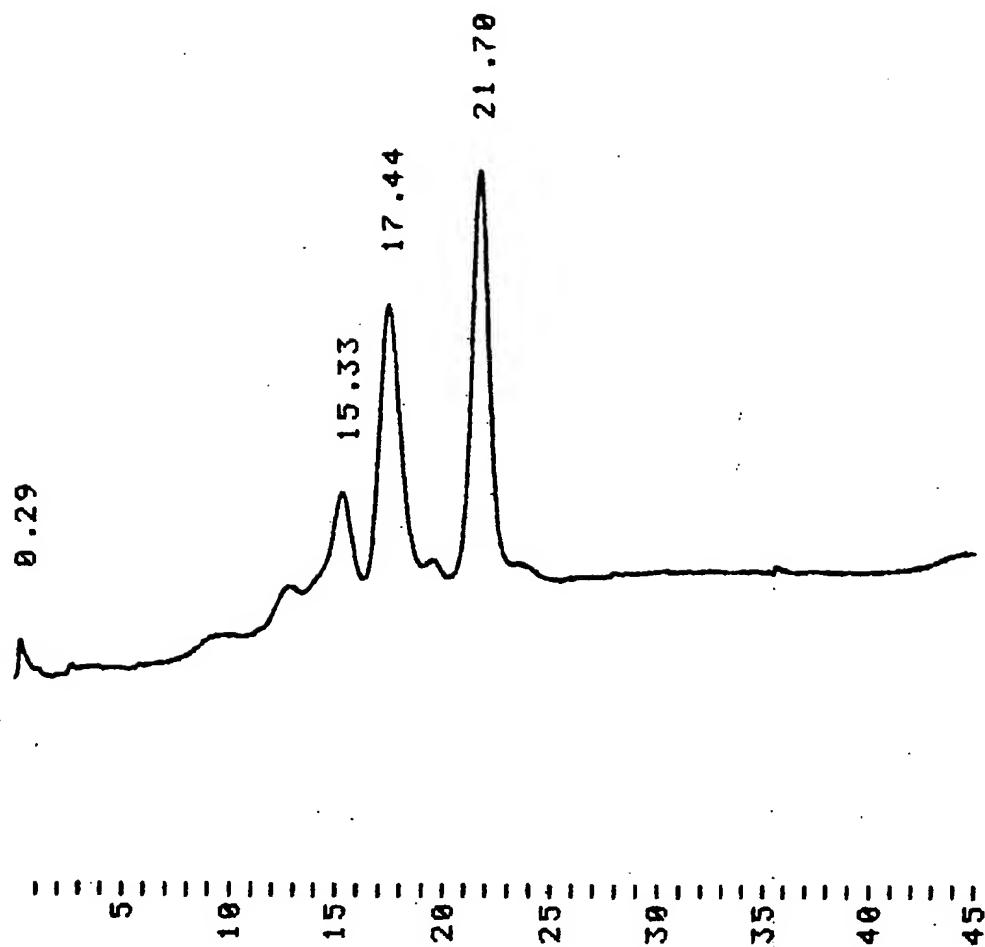
第10図



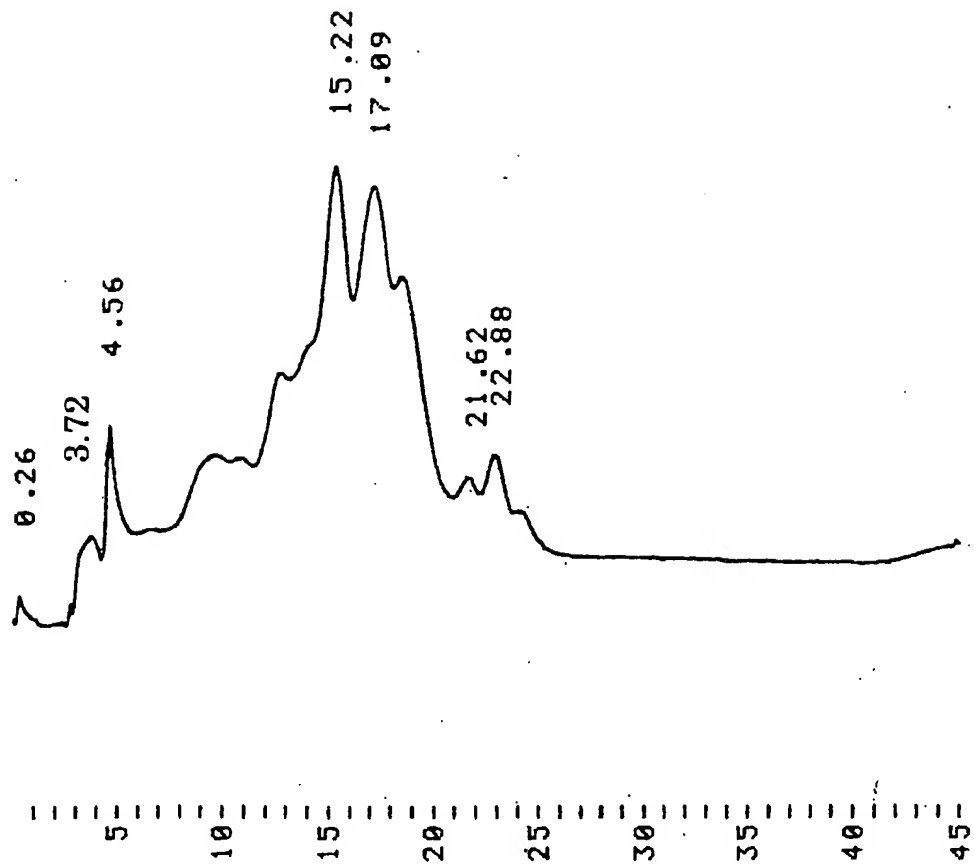
第 1 1 図



第 1 2 図



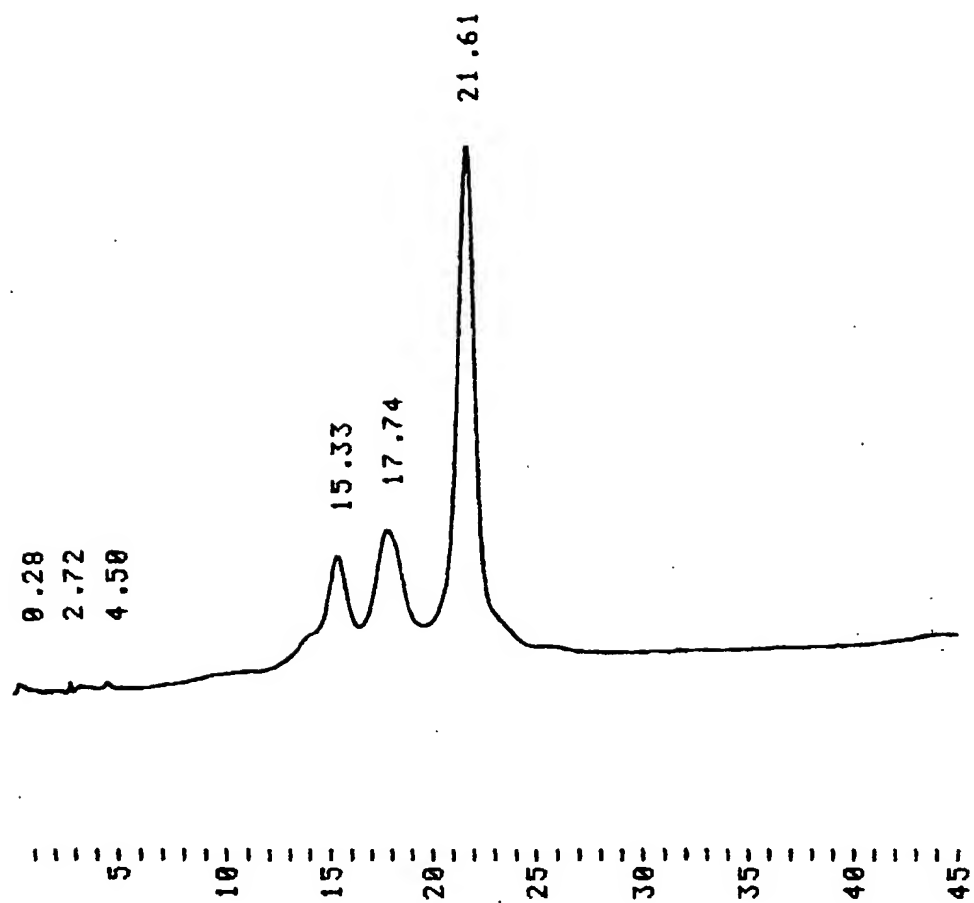
第13図



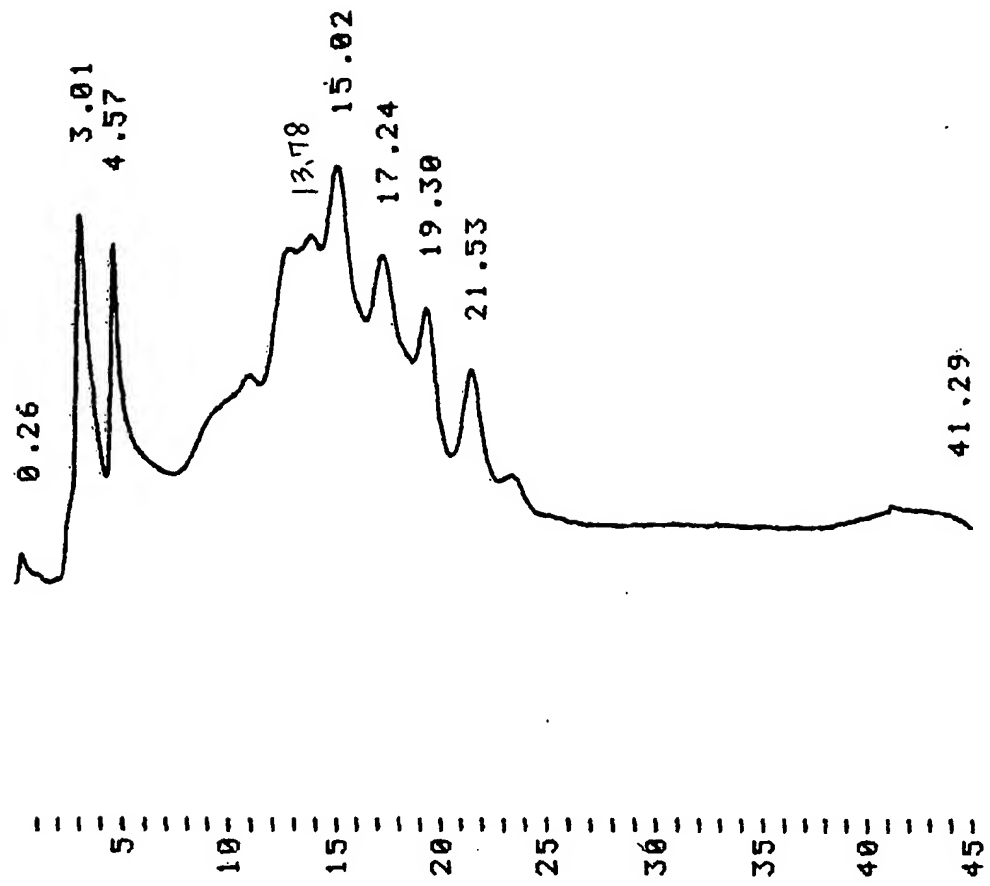
差 替 え 用 紙 (規則26)



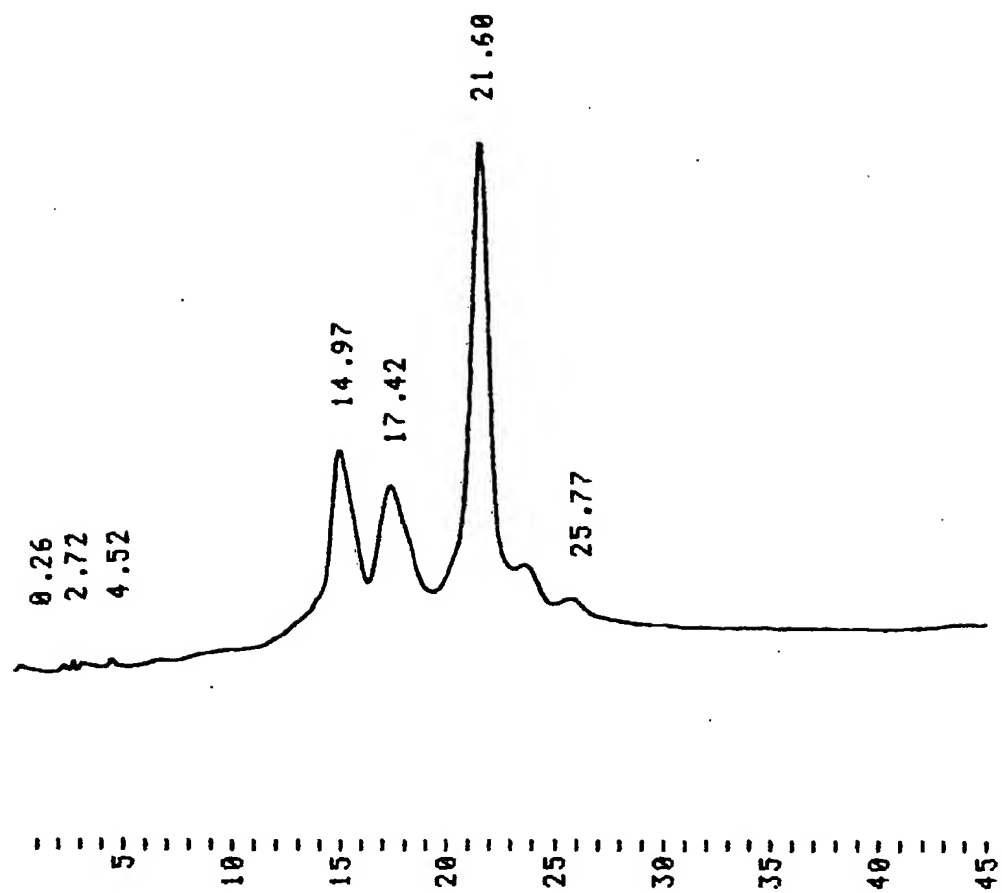
第 1 4 図



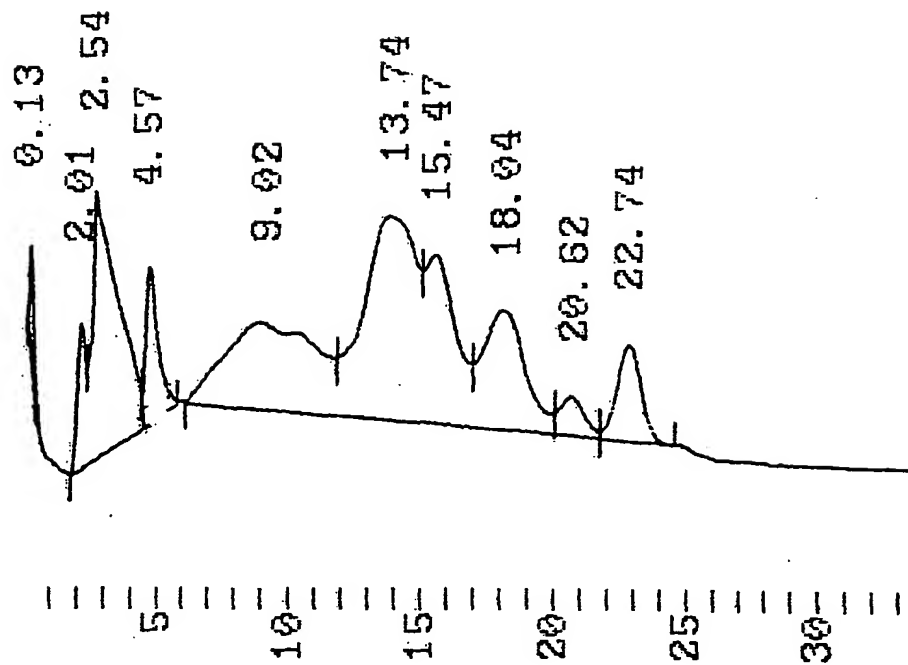
第 15 図



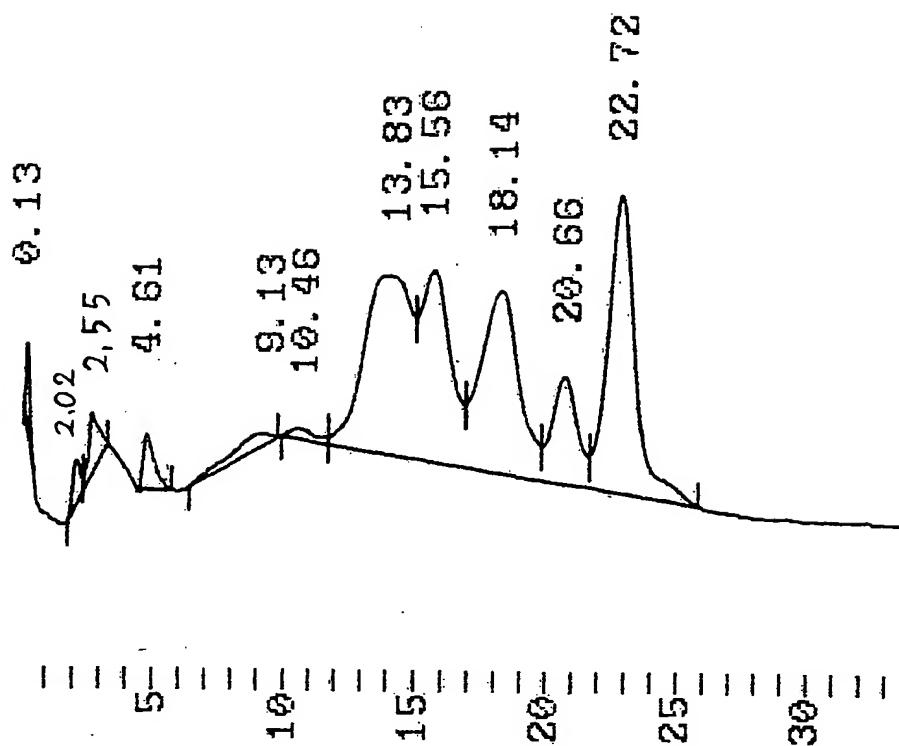
第16図



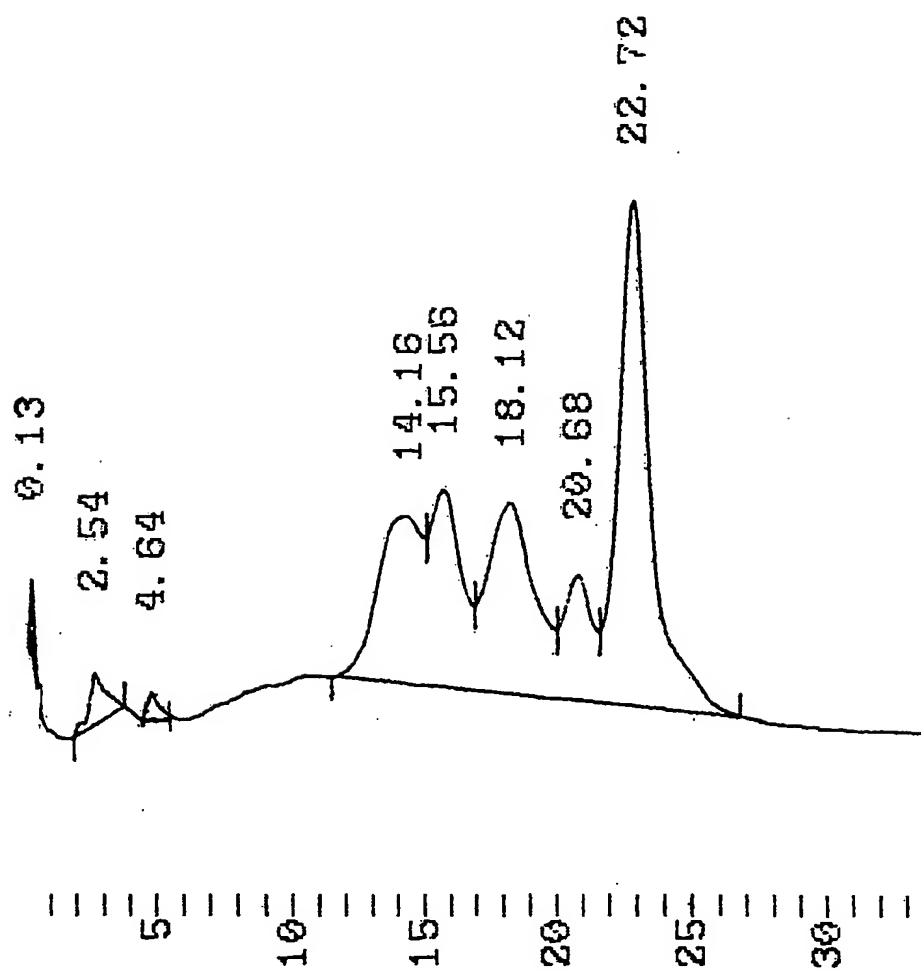
第7図



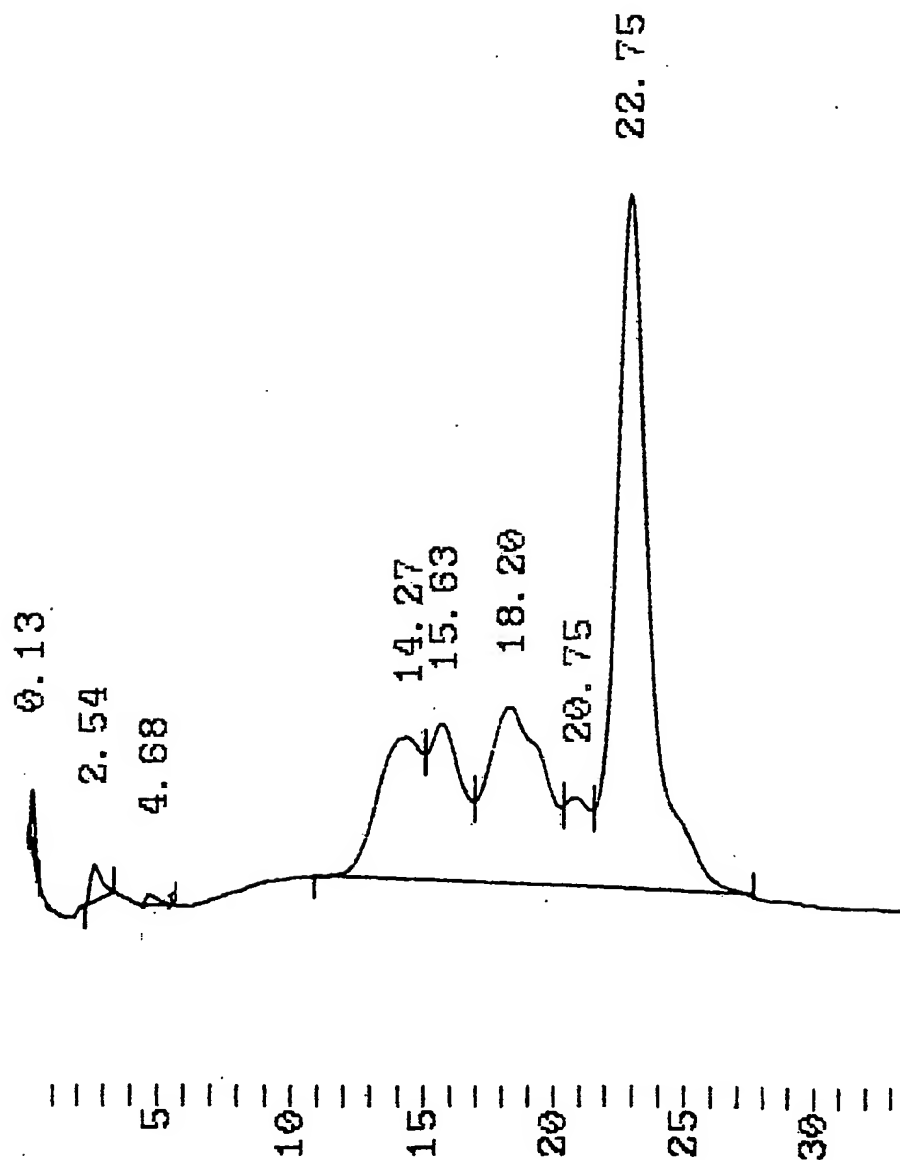
第18図



第9図



第20図



1 / 4

## SEQUENCE LISTING

&lt;110&gt; MITSUBISHI PHARMA CORPORATION

&lt;120&gt; Methods of activating proteins

&lt;130&gt; 02046W00

&lt;140&gt;

&lt;141&gt;

&lt;150&gt; JP P2001-370541

&lt;151&gt; 2001-12-04

&lt;160&gt; 8

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 9

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Inventor: Kouno, Takaharu; Katsumura Yasuhiko

&lt;400&gt; 1

Ile Ser Ser Cys Gly Phe Tyr Trp Asn

1

5

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 12

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 2

Ile Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr

1

5

10



<210> 3  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 3  
Ser Thr Arg Leu Arg Gly Ala Asp Tyr  
1 5

<210> 4  
<211> 17  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 4  
Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Asn Ser Asn Asn Lys Lys Tyr Leu  
1 5 10 15  
Ala

<210> 5  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 5  
Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser  
1 5

<210> 6  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 6

Gln Gln Tyr Tyr Ser Thr Pro Trp Thr  
1 5

<210> 7

<211> 119

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 7

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln  
1 5 10 15  
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Cys  
20 25 30  
Gly Phe Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln His Pro Gly Lys Gly Leu Glu  
35 40 45  
Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser  
50 55 60  
Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Leu Asp Thr Ser Lys Ser Gln Phe  
65 70 75 80  
Ser Leu Lys Leu Ser Ser Leu Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr  
85 90 95  
Cys Ala Arg Ser Thr Arg Leu Arg Gly Ala Asp Tyr Trp Gly Gln Gly  
100 105 110  
Thr Met Val Thr Val Ser Ser  
115

<210> 8

<211> 114

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 8

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly  
1 5 10 15  
Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Asn  
20 25 30

Ser Asn Asn Lys Lys Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln  
35 40 45  
Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val  
50 55 60  
Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr  
65 70 75 80  
Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln  
85 90 95  
Tyr Tyr Ser Thr Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile  
100 105 110  
Lys Arg

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/12701

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> Int.Cl <sup>7</sup> C12N15/09, C12P21/00, C12P21/08, C07K1/00		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) Int.Cl <sup>7</sup> C12N15/00-C12N15/28, C12P21/00-C12P21/08		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) JICST FILE(JOIS), SwissProt/PIR/GeneSeq, WPI(DIALOG), BIOSIS(DIALOG)		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
<u>X</u> A	EP 315782 A1 (THOMAE GMBH KARL), 17 May, 1989 (17.05.89), & DE 378649 A & AU 8823733 A & ES 2064336 T3 & JP 1-231887 A	<u>1-6, 10, 17, 19</u> 7-9, 11-16, 18, 20-44
X	WO 92/14749 A1 (UNIV LELAND STANFORD JUNIOR), 03 September, 1992 (03.09.92), & EP 572573 A1 & US 5284830 A & JP 6-508111 A	1, 2
<u>X</u> A	EP 5204799 A1 (MITSUBISHI KASEI CORP.), 30 December, 1992 (30.12.92), & JP 5-304987 A & DE 69224496 E & US 5767246 A	<u>41-44</u> 23, 24
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
<p>* Special categories of cited documents:</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> <p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>"&amp;" document member of the same patent family</p>		
Date of the actual completion of the international search 25 February, 2003 (25.02.03)		Date of mailing of the international search report 04 March, 2003 (04.03.03)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1998)

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/12701

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 8-70859 A (Takeda Chemical Industries, Ltd.), 19 March, 1996 (19.03.96), (Family: none)	1-40

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1998)

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl. C12N15/09, C12P21/00, C12P21/08, C07K1/00

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl. C12N15/00~C12N15/28, C12P21/00~C12P21/08

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

JICSTファイル (JOIS), SwissProt/PIR/GeneSeq, WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
<u>X</u> A	EP 315782 A1 (THOMAE GMBH KARL) 1989. 05. 17 & DE 378649 A & AU 8823733 A & ES 2064336 T3 & JP 1-231887 A	<u>1-6, 10, 17, 19</u> 7-9, 11-16, 18, 20-44
X	WO 92/14749 A1 (UNIV LELAND STANFORD JUNIOR) 1992. 09. 03 EP 572573 A1 & US 5284830 A & JP 6-508111 A	1, 2
<u>X</u> A	EP 5204799 A1 (MITSUBISI KASEI CORP) 1992. 12. 30 & JP 5-304987 A & DE 69224496 E & US 5767246 A	<u>41-44</u> 23, 24

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&amp;」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

25. 02. 03

国際調査報告の発送日

04. 03. 03

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

鈴木 恵理子

印

4N

8114

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	JP 8-70859 A (武田薬品工業株式会社) 1996. 03. 19 ファミリーなし	1 - 40